



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**



KERCIO ESTEVAM DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. E CONTROLE
ALTERNATIVO DO MAL DO PANAMÁ**

AREIA

2019

KERCIO ESTEVAM DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. E CONTROLE
ALTERNATIVO DO MAL DO PANAMÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Doutor** em Agronomia, Área de Concentração em Agricultura Tropical.

Orientação: Luciana Cordeiro do Nascimento

Coorientação: Élide Barbosa Corrêa

AREIA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586c Silva, Kercio Estevam da.

Caracterização de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. e controle alternativo do mal do Panamá / Kercio Estevam da Silva. - Areia:UFPB/CCA, 2020.
66 f. : il.

Orientação: Luciana Cordeiro do Nascimento,
Coorientação: Élide Barbosa Corrêa.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Extratos vegetais. 2. Filogenia. 3. Musa spp. I. Nascimento, Luciana Cordeiro do. II. Corrêa, Élide Barbosa. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.2)

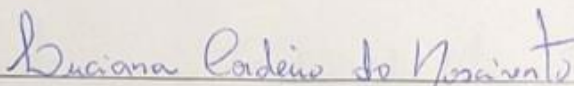
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. E CONTROLE
ALTERNATIVO DO MAL DO PANAMÁ

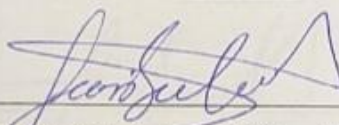
AUTOR: KERCIO ESTEVAM DA SILVA

COMISSÃO EXAMINADORA

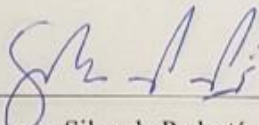


Prof. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento - PPGA/CCA/UFPB

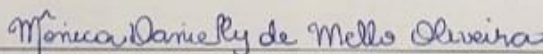
Orientadora



Prof. Dr. Jacinto de Luna Batista - PPGA/CCA/UFPB



Prof. Dr. Guilherme Silva de Podestá - PPGA/CCA/UFPB



Dra. Mônica Danielly de Mello Oliveira - Universidade de Évora

Data da realização 05 de fevereiro de 2019

Aos produtores de banana da microrregião do Brejo paraibano, a professora e orientadora Luciana Cordeiro do Nascimento, a professora e co-orientadora Élide Barbosa Corrêa, a Edvânia Abidon da Silva e Rafael Abidon Estevam da Silva e a todos os amigos (as) que contribuíram com o desenvolvimento dessa pesquisa.

Dedico

“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade”

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares que ajudaram em todos os momentos da minha vida, em especial, à minha mãe Maria das Dores Estevam da Silva (*in memoriam*) e ao meu sobrinho Altiéres Estevam da Silva (*in memoriam*).

Às Professoras Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento, orientadora prestativa, conselheira e motivadora em todos os momentos e Dra. Élide Barbosa Corrêa, co-orientadora, sempre atenciosa e motivadora deste a minha graduação e ao professor Dr. Walter Esfrain Pereira da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Campus II.

Aos produtores de banana da região do Brejo paraibano, pela gentileza e apoio durante esse trabalho construtivo e participativo.

Ao Prof. Dr. Sami Jorge Michereff que disponibilizou os isolados do fungo para serem estudados.

À UFPB - Centro de Ciências Agrárias (CCA), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia e a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) - Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CCAA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores e aos funcionários da UFPB - Campus II, e da UEPB - Campus II pela contribuição na minha formação profissional.

Aos colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Fitopatologia - UFPB e Breno de Oliveira Souza (*in memoriam*).

À Edvânia Abidon da Silva, por participar e ser fundamental na conclusão desse trabalho do início ao fim e ao meu filho Rafael Abidon Estevam da Silva.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO GERAL

O Brasil é o quinto maior produtor mundial de banana (*Musa* spp.), com grande parte da produção concentrada na região Nordeste. Dentre as doenças que acometem essa cultura destaca-se o mal do Panamá, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*). O manejo dessa doença tem sido realizado basicamente com o uso de variedades resistentes. No entanto, estratégias alternativas, como o uso de produtos naturais, devem ser pesquisadas para evitar a pressão de seleção que pode inviabilizar o controle genético. Face ao exposto, objetivou-se com esta pesquisa caracterizar genética e morfolologicamente isolados de *Foc*, oriundos de estados da região do Nordeste brasileiro e avaliar o controle alternativo da doença utilizando extrato de alho. Foram avaliados os efeitos de cinco concentrações do extrato aquoso de alho ($C_1 = 0$; $C_2 = 2,5$; $C_3 = 5$; $C_4 = 7,5$ e $C_5 = 10\%$), sobre isolados obtidos em coleções de fungos dos estados da Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia e Alagoas. No experimento *in vitro*, os isolados foram caracterizados morfolologicamente avaliando-se a coloração da frente e verso das colônias, diâmetro micelial, índice de velocidade de crescimento micelial e esporulação. A análise filogenética gerou uma árvore para os genes TEF e IGS pela análise Neighbor-Joining (NJ) com 21 sequências obtidas do GenBank, alinhando oito isolados de *Fusarium* spp. Os resultados obtidos na análise filogenética identificaram quatro grupos de *F. oxysporum* com linhagens filogenéticas distintas, sendo que o isolado CMM 0807 ficou agrupado como espécie de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, com 99% de suporte *bootstrat*. Nos experimentos *in vivo*, avaliou-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) usando-se uma escala de notas, com mudas da cultivar Pacovan. A inoculação das mudas foi feita no rizoma pela imersão dos mesmos na suspensão do patógeno, ajustada para 10^6 conídios mL⁻¹. As concentrações crescentes do extrato de alho promoveram reduções significativas no crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e na severidade do mal do Panamá.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Filogenia. *Musa* spp.

GENERAL ABSTRACT

Brazil is the fifth largest producer of banana (*Musa* spp.), concentrating its great production in the northeast region of the country. Among the diseases that affect this crop, Panama caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) stands out. In order to contain this disease, some sources of resistance have been applied. However, some alternative strategies, as natural products, must be verified to avoid selection pressure, which can preclude genetic control. Thus, this research aimed to characterize genetically and morphologically *Foc* isolated from states of Brazilian northeast region (Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia and Alagoas) and evaluate an alternative method to control the disease using aqueous garlic extract ($C_1 = 0$; $C_2 = 2.5$; $C_3 = 5$; $C_4 = 7.5$ and $C_5 = 10\%$). *Foc* isolated *in vitro* were morphologically characterized by analyzing the color of both sides of colonies, mycelial diameter, mycelial growth speed index and sporulation. Phylogenetic analysis generated a tree for TEF and IGS genes using Neighbor-Joining (NJ) analysis with 21 sequences obtained from GenBank, by aligning eight *Fusarium* spp. The results obtained in the phylogenetic analysis identified four groups of *F. oxysporum* with distinct phylogenetic lines, with CMM 0807 grouped with *F. oxysporum* f. sp. *cubense* specie with 99% of bootstrap support. In *in vitro* experiments, the area under the disease progress curve (AUDPC) was analyzed using a note scale with cultivar Pacovan seedlings. The inoculation was made in the rhizome through its immersion and the pathogen suspension adjusted to 10^6 conidia mL⁻¹. The growing concentration of garlic extract significantly reduced mycelial *F. oxysporum* f. sp. *cubense* growth and the Panama disease.

Keywords: Plant extracts. Phylogeny. *Musa* spp.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1. Árvore filogenética obtida por meio da análise Neighbor-Joining (NJ) baseada nos genes TEF e IGS para 29 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, oito das quais sequenciadas neste estudo. A barra de escala indica o número de mudanças esperadas por locus 35

Figura 2. Crescimento micelial dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *in vitro* em função dos dias de avaliação. Isolados: CMM-0813 (A); CMM-0807 (B); K01 (C); K10 (D); CMM-1236 (E); CMM-2820 (F); CMM-2910 (G) e CMM-2916 (H) 39

Figura 3. Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *in vitro* em função dos dias de avaliações. Isolados: CMM-0813 (A); CMM-0807 (B); K01 (C); K10 (D); CMM-1236 (E); CMM-2820 (F); CMM-2910 (G) e CMM-2916 (H)..... 43

Figura 4. Esporulação de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *in vitro*, à 25 ± 2 °C, após sete dias de incubação. Lagoa Seca, PB, 2019 45

Capítulo III

Figura 1. Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense*, isolados K01(A) e CMM-0807 (B) sob diferentes concentrações (0; 2,5; 5; 7,5 e 10%) do extrato aquoso de alho, aos 5 dias após inoculação em meio BDA em placas de Petri. Lagoa Seca, PB, 2019..... 57

Figura 2. Severidade dos isolados de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* em rizomas de bananeira Pacovan inoculadas, em casa de vegetação. Lagoa Seca, PB, 2019 58

Figura 3. Severidade do isolado K01 (A) e CMM-0807 (B) de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* em rizomas de bananeira Pacovan, em casa de vegetação sob efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de Alho. Lagoa Seca, PB, 2019 59

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1. Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> incluídos na análise filogenética	31
Tabela 2. Primers utilizados no estudo	32
Tabela 3. Origem e coloração da colônia <i>in vitro</i> * de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> . Lagoa Seca, PB, 2019.....	36
Tabela 4. Crescimento micelial de isolados de <i>Fusarium</i> em BDA em função do tempo em dias. Areia, PB, 2019.....	37
Tabela 5. Crescimento micelial de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> in vitro em função do tempo em dias. Lagoa Seca, PB, 2019.....	38
Tabela 6. Índice de Velocidade de crescimento micelial de isolados de <i>Fusarium</i> em BDA em função do tempo em dias. Areia, PB, 2019.....	41
Tabela 7. Índice de velocidade de crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> in vitro em função do tempo (dias). Lagoa Seca, PB, 2019.....	41

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Cultura da bananeira.....	12
2.2 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> agente causal do mal do Panamá em bananeira.....	13
2.3 Diversidade genética de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	14
2.4 Manejo alternativo de doenças de plantas.....	16
2.4.1 Extrato de alho no controle de doenças de plantas.....	17
REFERÊNCIAS.....	17

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
Localização e obtenção de isolados.....	28
Isolamento e multiplicação do patógeno.....	28
Caracterização molecular dos isolados e extração de DNA.....	29
Análise filogenética de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	29
Caracterização morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	32
Teste de agressividade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	33
Análise dos dados.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

CAPÍTULO III

CONTROLE DO MAL DO PANAMÁ COM EXTRATO DE ALHO.....	51
RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
Localização do experimento.....	54
Coleta do material vegetal e isolados.....	54
Teste de Agressividade.....	55
Obtenção do extrato de Alho.....	55
Avaliação do efeito do extrato de alho no crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	55
Avaliação do extrato de alho no manejo do mal do Panamá.....	55
Análise dos Dados.....	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da bananeira (*Musa* spp.) é originária do sul e sudeste do continente asiático. Destaca-se como umas das principais frutíferas cultivadas mundialmente e, ocupa o segundo lugar no cenário comercial das frutas (FAO, 2017), sendo produzida principalmente em países tropicais. A Índia é o maior produtor com 29,11 milhões de toneladas produzidas em 2016, seguido por China e Brasil (FAO, 2017). O Brasil, em 2018, produziu cerca de sete milhões de toneladas, com distribuição da bananicultura concentrada na região Nordeste com 34% da produção, seguida pelo Sudeste (IBGE, 2018).

A bananeira apresenta vários problemas fitossanitários, destacando-se o mal-do-Panamá, que ocorre principalmente nos banais das cultivares Maçã, Pacovan, Prata e ultimamente, vem atacando a cultivar do grupo Cavendish (MAPA, 2018). Essa doença é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) e apresenta-se com um grau de agressividade acima de 80%, causando morte das plantas e dificultando ou impedindo a implantação de novas áreas, pois o fungo pode sobreviver no solo (MARYANI et al., 2019).

Um dos maiores obstáculos para a manutenção da resistência da bananeira reside na variabilidade dos patógenos. Portanto, é importante e fundamental conhecer as raças e/ou patótipos predominantes em um determinado local e sua epidemiologia, para contribuir com os programas de melhoramento. As técnicas de biologia molecular para diagnosticar os patógenos têm contribuído para desmembrar a diversidade genética, através de marcadores moleculares (DITA et al. 2010; MARYANI et al., 2019).

Nesse sentido, metodologias mais seguras têm sido, baseadas em estudos de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) e no uso do DNA para identificação de raças do *Foc* (DIAS et al., 2014; MAPA et al., 2018). As técnicas de biologia molecular, análise das regiões rDNA-ITS e o gene codificador do fator de alongação (TEF) têm contribuído para os estudos de variabilidade de *Fusarium* spp. (SILVA et al., 2010; DIAS et al., 2014). Os marcadores moleculares são diferenciados devido ao emprego de tecnologias para identificar a variabilidade em nível de DNA (MARYANI et al., 2019).

Uma forma de manejo de doenças de plantas ocorre por meio de produtos naturais, incluindo os extratos vegetais, que se baseiam no potencial dos metabólitos secundários das plantas em apresentarem potencial antimicrobiano, e vem proporcionando importantes avanços para a agricultura (MANDIRIZA et al., 2018; YAHYA et al., 2018). Vários estudos avaliando o uso de extratos vegetais no controle de fitopatógenos vêm sendo realizados com o objetivo de substituir os defensivos sintéticos (FERREIRA et al., 2014; BRITO; NASCIMENTO, 2015; MANDIRIZA et al., 2018; YAHYA et al., 2018).

O uso de extratos vegetais para o controle de doenças em plantas estão relacionados à sua atividade antimicrobiana tanto direta quanto indireta, por induzir a resistência da planta ao patógeno (DEMARTELAERE et al., 2015; MANDIRIZA et al., 2018) e são alternativas para o controle do *Foc*. Portanto, são de suma importância para a preservação dos sistemas de produção de banana.

Diante do exposto, objetivou-se com esta pesquisa caracterizar geneticamente e morfológicamente isolados de *Foc*, oriundos de estados da região do Nordeste brasileiro e avaliar o controle alternativo da doença utilizando extrato de alho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura da bananeira

A bananeira (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea pertencente à família botânica *Musaceae* e originária da região sudoeste da Ásia. Os principais países produtores de banana são a Índia (15% da produção total), China, Equador, Brasil e Filipinas. Cerca de 15 a 20% do total da produção de bananeira no mundo é comercializada internacionalmente. Os principais países exportadores dessa fruta são Equador, Costa Rica, Filipinas, Colômbia, Panamá e Honduras. Já os principais países/regiões importadores são Estados Unidos, Canadá, União Européia, Japão, Federação Russa e Oriente (FAO, 2017).

A importância do cultivo da bananeira está relacionada à produção de fruto nutritivo, bastante energético, rico em carboidratos e sais minerais, como sódio, magnésio, fósforo e, especialmente, potássio, vitaminas A e C. Contém também as vitaminas B1, B2 e B6, além de ser um produto acessível à maior parte da população (SOUZA et al., 2011).

O Brasil produz cerca de sete milhões de toneladas, em uma área de 465.434 hectares e apresenta condições favoráveis para o cultivo da bananeira, sendo cultivada na maioria dos estados brasileiros. Destacam-se os da região Nordeste, sendo eles Bahia (866.591 t), Pernambuco (413.311 t), Rio Grande do Norte (210.933 t) e Paraíba (135.153 t). Atualmente, a região Nordeste ocupa o primeiro lugar em termos de produção, com mais de dois milhões de toneladas produzidas (IBGE, 2018).

A bananeira necessita de calor constante, precipitações bem distribuídas e umidade elevada para obter desenvolvimento e produção de qualidade (IBGE, 2018). A microrregião do Brejo paraibano apresenta condições edafoclimáticas favoráveis para a produção, além de uma importância social e econômica, contribuindo com um percentual de produção relevante no estado (EMEPA, 2015).

A cultura vem enfrentando uma série de dificuldades ocasionadas principalmente pela falta de tecnologias para melhoria da produção, ausência de práticas de manejo adequadas, e problemas com insetos pragas e patógenos que comprometem a produção e produtividade em todas as regiões de cultivo.

2.2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* agente causal do mal do Panamá em bananeira

O gênero *Fusarium* teve sua descrição original em 1908, sendo que suas características principais são a formação de conídios fusiformes e alongados, além de apresentarem vários septos com a evolução do seu crescimento (GERLACH; NIRENBERG, 1982). É o terceiro gênero de fungos com maior número de espécies que causam doenças em plantas, além de produzirem uma ampla gama de toxinas e metabólitos secundários que além de doenças em plantas, podem também causar danos à saúde humana e animal (GOLDSCHMIED et al., 1993; LESLIE; SUMMERELL, 2006; CUNHA et al., 2015).

O mal do Panamá é uma doença cosmopolita que ocorre em todas as regiões produtoras de bananeira do mundo, sendo uma das mais importantes doenças de plantas cultivadas e responsável por grandes perdas econômicas da cultura (CUNHA et al., 2015).

O agente causal do mal do Panamá pertence ao Domínio Eucaryota, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Subclasse Sordariomycetes e Ordem Hypocreales. *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) possui alta capacidade evolutiva e, devido a isso, muitas abordagens são utilizadas para caracterizar seus isolados (FOURIE et al., 2009). Espécies de *Fusarium* spp. foram responsáveis pela ocorrência de fenômenos sociais importantes, como o surto do mal do Panamá, onde *Foc* devastou vários plantios de bananeira na América Central, na década de 1960 (PLOETZ, 1990).

O fungo apresenta um grande crescimento de micélio aéreo e a coloração é variada do branco para o violeta, em ágar-batata-dextrose (BDA), as suas colônias variam de 4 a 7 mm dia, sob uma temperatura de 24 a 27 °C (PLOETZ, 2006). Os esporos apresentam-se como microconídios (unicelulares, reniforme, hialinos) e macroconídios (sendo fusiformes) (PUHALLA, 1981; GEISER et al., 2004).

O *Foc* teve sua primeira constatação no Brasil em 1930, na cidade de Piracicaba, localizada no estado de São Paulo, na cultivar Maçã, dizimando cerca de um milhão de plantas em apenas quatro anos (GOES; MORETO, 2010). Nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Goiás grandes áreas de bananeira Maçã foram totalmente destruídas com o ataque desse patógeno. O grupo “Prata” teve em média 20% das plantas eliminadas decorrente da infecção pelo patógeno (PLOETZ, 1990; MATOS et al., 1998).

O patógeno inicia com a infecção através das radículas, posteriormente nas raízes, causando danos no sistema vascular, e consequentemente, infecção sistêmica (STOVER, 1962). Após a infecção, os sintomas são observados na parte externa e também internamente, fazendo o corte do rizoma, juntamente com o pseudocaule, no período entre 2 a 5 meses após a infecção (CORDEIRO et al., 2005).

Na parte externa é observado um sintoma de coloração amarela progressiva das folhas mais velhas para as folhas mais novas, seguido de murcha, com a quebra do pecíolo junto ao pseudocaule, dando a planta o aspecto típico de um “guarda-chuva fechado”. Outro sintoma é a rachadura do pseudocaule próximo ao solo. Nos sintomas internos, aparecem algumas pontuações avermelhadas e descoloração vascular ao se realizarem cortes transversais ou longitudinais no pseudocaule ou rizoma (VENTURA; HINZ, 2002).

A disseminação do patógeno ocorre através dos rizomas, raízes e pseudocaule das plantas doentes, liberando uma grande quantidade de inoculo na superfície do solo. A transmissão do patógeno ocorre pelo contato das raízes de plantas sadias com o inoculo e através da água de irrigação, de drenagem e de inundação, animais, humanos, equipamentos, ferramentas; e material de plantio infectado (VENTURA; HINZ, 2002). Meldrum et al. (2013) detectaram o patógeno no exoesqueleto do *Cosmopolites sordidus*, coleóptero conhecido como moleque da bananeira ou broca da banananeira, como um possível vetor da doença.

Para controlar a disseminação do patógeno, uma das alternativas é uso de mudas micropropagadas selecionadas (CORDEIRO et al., 2005). Clamidósporos são as principais estruturas de sobrevivência do patógeno, permitindo a presença do mesmo por décadas no ambiente, na ausência do hospedeiro (PLOETZ, 2015).

2.3 Diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

A análise da diversidade de *Foc* está relacionada com vários eventos moleculares e morfológicos, relacionados ao diferenciamento das espécies, sendo essenciais para o desenvolvimento de estratégias de manejo (CUNHA et al., 2015).

Foram identificadas quatro raças fisiológicas do patógeno, sendo que as mais virulentas na bananeira são as raças 1, 2 e 4. No Brasil, analisando os grupos de compatibilidade vegetativa, observa-se que a raça 1 apresenta uma maior prevalência em relação as outras raças (GOES; MORETTO, 2010). Biótipo da raça 4, a raça tropical 4 ou TR4 foi reportado em pomares comerciais de bananeira na Austrália, Malásia Taiwan, China, Filipinas destruindo totalmente diversas plantações de bananeira. A raça TR4 é bastante disseminada e

agressiva em países dos continentes africano e americano, os quais concentram os maiores produtores de bananicultura mundial, ocasionando danos aos plantios e reduzindo a produção (PLOETZ, 2009).

Na identificação em nível de espécies de fungos é necessário fazer uma avaliação dos caracteres morfológicos e complementação com técnicas moleculares (MARYANI et al., 2019). Contudo, o conceito de espécie morfológica é de grande importância para a classificação e caracterização morfológica de espécies. Os caracteres morfológicos têm sido usados como marcadores para diferenciar populações, porém, a quantidade de caracteres detectados é insuficiente ao considerar o número de espécies a serem comparadas (SOUZA, 2016), surgindo à necessidade da utilização de outros métodos.

Técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para a caracterização de fungos fitopatogênicos. A caracterização genética de *Foc* é pesquisada com o propósito de gerar benefícios para o manejo do fungo, se baseando na aplicação de marcadores moleculares (FOURIE et al., 2009; SILVA et al., 2010; VISSER et al., 2010), que diferenciam-se pela tecnologia utilizada, com objetivo de verificar a variabilidade em nível de DNA, e assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos (DIAS et al., 2014; CUNHA et al., 2015).

Diversas metodologias estão sendo estudadas com relação à variabilidade genética e a identificação de patógenos, sendo que a maior parte é baseada na utilização de marcadores moleculares. A sua utilização tem aumentado a cada ano, possibilitando a ampliação dos conhecimentos dos aspectos da diversidade genética dos fitopatogênicos (DUTECH et al., 2007; SANTOS et al., 2011).

O uso de marcadores moleculares é eficiente, sendo uma técnica adicional de estudo para a classificação taxonômica de *Fusarium* spp., e pode elucidar dúvidas quanto à *formae speciales*. Costa et al. (2015) estudando a diversidade genética de *Foc* analisaram 214 isolados de diferentes estados produtores de bananeira em três regiões do Brasil (Nordeste, Sudeste e Sul) e testaram nove marcadores microsatélites (SSR) e os resultados indicaram que os isolados de diferentes estados apresentaram diferenças genômicas.

O gene codificador do fator de alongação (TEF) é comumente utilizado como marcador filogenético para a diferenciação de espécies do gênero *Fusarium* (O'Donnell et al., 1998). O gene TEF-1 α que codifica no mecanismo de tradução de proteínas, uma parte importante que tem utilidade filogenética, surge de uma cópia única em *Fusarium*, demonstrando um alto nível de polimorfismo nas sequências das espécies intimamente relacionadas, mesmo em comparação com as porções ricas em introns de genes que codificam proteínas, como

calmodulina, β tubulina e histona H3. Por isso, TEF-1 α tem sido uma ferramenta para a identificação de espécies de *Fusarium* (CHANDRA et al., 2011).

O'Donnell (2013) trabalhando com *Foc* usando polimorfismos anônimos de comprimento de fragmento para definir 10 linhagens clonais mostraram que, patógenos da bananeira poderiam estar intimamente relacionados à patógenos de outros hospedeiros, como em tomateiro. Assim, a diversidade genética de *Foc* é considerável, tendo sido encontradas algumas linhagens distintas.

Thangavelu et al. (2012) analisando 107 isolados de *Foc* de diferentes regiões da Índia por meio de marcadores ISSR, verificaram ampla diversidade genética, assim como, a origem polifilética dos isolados, sendo que os marcadores separaram os isolados de *Foc* em sete grupos, com base nas raças e grupo de compatibilidade vegetativa.

2.4 Manejo alternativo de doenças de plantas

A busca no mercado por produtos agrícolas elaborados com substâncias naturais vem aumentando gradativamente e a pesquisa tem recorrido a novas práticas de manejo integrado de doenças (FAROOQ et al., 2011; BORGES et al., 2013).

Pesquisas mostram que os metabólitos secundários das plantas, podem contribuir como um método alternativo de controle de doença, pois os conhecimentos e estudos atuais reforçam sua possível utilização, bem como a determinação da atividade biológica, em relação à atividade elicitora ou antimicrobiana (PAES et al., 2013; SAROJ et al., 2015). De acordo com Bettiol e Ghini (2015), o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de doenças de plantas busca diminuir o uso excessivo de agrotóxicos e contribuir para uma agricultura que seja mais adequada às novas exigências de mercado, socialmente justa, economicamente viável e ecologicamente correta. Desta forma, pesquisas vêm sendo feitas com a utilização de extratos de plantas com propriedades antifúngicas e indutores de resistência, já que a presença destes estimula a produção de fitoalexinas, substâncias envolvidas na defesa natural das plantas (PINTO, 2013; MÉLO-FILHO; GUENTHER, 2015; MANDIRIZA et al., 2018).

Extratos aquosos e óleos essenciais oriundos de plantas medicinais, têm demonstrado ação fungitóxica, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos; e de indução de resistência, induzindo a síntese de fitoalexinas nas plantas onde esses são aplicados (DEMARTELAERE et al., 2015; MANDIRIZA et al., 2018; YAHYA et al., 2018). De acordo com Mengane e Kamble (2014) diferentes concentrações de extratos vegetais de

Azadirachta indica, *Artemisia annua*, *Eucalyptus globulus* e *Ocimum sanctum* utilizados para controlar o mal do Panamá reduziram significativamente o crescimento do patógeno.

2.4.1 Extrato de alho no controle de doenças de plantas

As propriedades antimicrobianas do alho (*Allium sativum* L.) vêm sendo estudadas desde a primeira metade do século XX, quando foram identificados efeitos positivos de extratos aquosos naturais derivados do bulbo, eficazes em inibir o crescimento de colônias de diversas espécies de fungos fitopatogênicos (CAVALITTO et al., 1944). Esse extrato também apresentou efeitos como bactericida, vermífugo, antiviral e antiprotozoário (CARRICONDE et al., 1996).

Amorim et al. (2011) identificaram que o extrato de alho possui efeito inibidor de fitopatógenos. Com relação aos componentes sulfatados do alho, o componente biológico mais ativo é a alicina (dialil-tiosulfonato), que representa 70% dos compostos sulfatados (ARNAULTA et al., 2004). A alicina é o componente responsável pelo odor característico do alho e uma forma de defesa contra as agressões vindas do exterior, não estando presente no alho intacto, produz-se apenas quando o alho é cortado ou esmagado (MENDES, 2008). Quando as células do alho são rompidas, quebram-se também as membranas que isolam a alicina da alinase presentes e o seu contato permite a formação de ácido e outros compostos sulfatados que também se convertem, combinando-se rapidamente entre si. Os compostos resultantes e por condensação enzimática formam a alicina (MIRON et al., 2004).

Huang et al. (2012) utilizando extrato aquoso de alho sobre *Foc* Raça 4, constataram a mortalidade dos esporos entre 87 e 91%. Souza e Soares (2014) destacaram a capacidade fungitóxica do extrato aquoso de alho, no controle de *Aspergillus niger*, comprovando o seu potencial fungitóxico, ocorrendo inibição total do crescimento micelial e da esporulação *in vitro*. Morais et al. (2010), avaliando o efeito dos extratos de alho e agave (*Agave angustifolia*) sobre a murcha-de-fusário no feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.), verificaram que os extratos inibiram a germinação de conídios, na medida em que aumentaram as concentrações.

REFERÊNCIAS

AMORIM, E. P. R.; ANDRADE, F. W. R.; MORAES, E. M. S.; SILVA, J. C. LIMA, R. S.; LEMOS, E. E. P. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o

desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.Especial, p.392-398, 2011.

ARNAULTA, I.; CHRISTIDÈS, J. P.; MANDON, N.; HAFFNER, T.; KAHANEC, R. HIGH- Performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. **Journal of Chromatography**, v.991, p.69-75, 2004.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Métodos alternativos usados com sucesso no Brasil para o controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: Editora da UFSC, p.143-157, 2015.

BORGES, I. V.; PEIXOTO, A. R.; CAVALCANTI, L. S.; LIMA, M. A. G.; SILVA, M. Extratos de jurema preta no controle de mancha-de-alternaria em melancia. **Revista Caatinga**, v.26, p.36-45, 2013.

BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.2, p.230-238, 2015.

CARRICONDE, C.; MORES, D.; VON FRITSCHEN, M.; CARDOZO-JUNIOR, P. O. **Plantas medicinais e alimentícias**. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular, Universidade Federal Rural de Pernambuco, v.1, p.45-47, 1996.

CAVALLITO, C. J.; BUCK, J. S.; SUTER, C. M. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* determination of Chemical structure. **Jornnal American Chemical Society**, v.66, p.1952-54, 1944.

CHANDRA, N. S.; WULFF, E. G.; UDAYASHANKAR, A. C.; NANDINI, B. P.; NIRANJANA, S. R.; MORTENSEN, C. N.; PRAKASH, H. S. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, n.5, p.1625-1639, 2011.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.) In: Doenças Da Bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia. Agrônômica Ceres**, v.2, p.99-117, 2005.

COSTA, S. N.; BRAGANCA, C. A. D.; RIBEIRO, L. R.; AMORIM, E. P.; OLIVEIRA, S. A. S.; DITA, M. A.; LARANJEIRA, F. F.; HADDAD, F. Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different regions from Brazil, **Plant Pathology**, v.64, p.137-146, 2015.

CUNHA, C. M. S.; HINZ, R. H.; PEREIRA, A.; TCACENCO, F. A.; PAULINO, E. C.; STADNIK, M. J. A SCAR marker for identifying susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana. **Scientia Horticulturae**, v.191, p.108-112, 2015.

DEMARTELAERE, A. C. F.; GUIMARÃES, G. H. C.; SILVA, J. A.; LUNA, R. G.; NASCIMENTO, L. C. Extratos vegetais no controle da antracnose e na conservação da qualidade em frutos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1041-1048, 2015.

DIAS, J. S. A.; ABREU, M. S.; RESENDE, M. L. V. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil. **Biota Amazônia**, v.4, n.4, p.60-65, 2014.

DITA, M. A.; WAALWIJK, C.; BUDDENHAGUEN, I. W.; SOUZA, M. T.; KEMA, G. H. J. A molecular diagnosis for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. **Plant Pathology**, v.59, p.348-357, 2010.

DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; FRANÇOIS, D.; BARRES, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.44, p.933-949, 2007.

EMEPA - Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A. **Relatório de Atividades da EMEPA-PB** - João Pessoa-PB, p.9-19, 2015.

FAO - Food and Agricultural Organization. **Agricultura Brasileira: Perspectivas e Desafios**. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en>. Acesso em: 10 de nov. 2017.

FAROOQ, M.; JABRAN, K.; CHEEMA, Z. A.; WAHID A.; SIDDIQUE K. H. M. THE role of allelopathy in agricultural pest management. **Management Science**, v.67, n.5, p.493-506, 2011.

FERREIRA, E. F.; JOSÉ, A. R. S.; BOMFIM, M. P.; PORTO, J. S.; JESUS, J. S. Uso de extratos vegetais no controle *in vitro* do *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. coletado em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.2, p.346-352, 2014.

FOURIE, G.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; VILJOEN A. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. **Applied and environmental microbiology**, v.75, n.14, p.4770-4781, 2009.

GEISER, D. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.473-479, 2004.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium* - A pictorial atlas**. Biologische Bundesanstalt, Berlin. 406p. 1982.

GOES, A.; MORETTO, K. C. K. Mal-do-Panamá. In: RUGGIEIRO, C. **Bananicultura**, v.2, p.122-128, 2010.

GOLDSCHMIED, R. A.; FRIEDMAN, A. J.; BLOCK, C. S. *Fusarium* spp. isolated from non-ocular sites: a 10 year experience at an Israeli general hospital. **Journal of Mycologie Medicale**, v.3, p.99-102, 1993.

HUANG, Y. H.; WANG, R. C.; LI, C. H.; ZUO, C. W.; WEI, Y. R.; ZHANG, L.; YI, G. J. Control of *Fusarium* wilt in banana with Chinese leek. **Plant Pathology**, v.134, n.1, p.87-95, 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, v.29, n.2, p.1-81, 2018.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. 1st ed. Blackwell Publishing, Victoria, Australia. 388p. 2006.

MANDIRIZA, G.; KRITZINGER, Q.; AVELING, T. A. S. The evaluation of plants extracts, biocontrol agents and hot water as seeds treatments to control black rot of rape in South África. **Crop Protection**, v.114, p.129-136, 2018.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Raça 4 Tropical de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*: subsídios para caracterização de praga quarentenária ausente**. 37p. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: MAPA/SDA, 2018.

MARYANI, N.; LOMBARD, L.; POERBA, Y. S.; SUBANDIYAH, S.; CROUS, P. W.; KEMA, G. H. J. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. **Studies in Mycology**, v.92, p.155-194, 2019.

MATOS, A. P.; BORGES, M. F.; SILVA, S. O.; CORDEIRO, Z. M.; ANDRADE, S. M. **Reaction of banana genotypes to *fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) under field conditions in Brazil**. Reunion Acorbat, p.311-319, 1998.

MELDRUM, R. A.; DALY, A. M.; TRAN-NGUYEN, L. T. T.; AITKEN, E. A. B. Are banana weevil borers a vector in spreading *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in banana plantations? **Australasian Plant Pathology**, v.42, n.5, p.543-549, 2013.

MÉLO-FILHO, L. R.; GUENTHER, M. A resistência sistêmica induzida como alternativa sustentável ao uso de agrotóxicos. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v.8, p.27-38, 2015.

MENDES P. A. P. Estudo do Teor de Alicina em Alho. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior de Tecnologia e de Gestão de Bragança, Portugal, 2008.

MENGANE, S. K.; KAMBLE, S. S. Bioefficacy of plant extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing panama wilt of banana. **Biological Sciences**, v.4, n.3, p.4-27, 2014.

MIRON, T.; BERCOVICI, T.; RABINKOV, A.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D. Allicin: preparation and applications. **Analytical Biochemistry**, v.331, p.364-369, 2004.

MORAIS, M. S.; ARAÚJO, E.; ARAÚJO, A. C.; BELÉM, L. F. Eficiência dos extratos de alho e agave no controle de *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.5, n.2, p.89-98, 2010.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.2044- 2049, 1998.

O'DONNELL, K.; ROONEY, A. P.; PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; McCORMICK, S. P.; WARD, T. J.; FRANDSEN, R. J.; LYSØE, E.; REHNER, S. A.; AOKI, T.; ROBERT, V. A.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; KANG, S.; GEISER, D. M. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, v.52, p.20-31, 2013.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; LIMA, C. R.; BASTOS, P. M.; MEDEIROS NETO, P. N. Taninos condensados da casca de Angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. **Revista Caatinga**, v.26, n.3, p.22-27, 2013.

PINTO, K. M. S. Substâncias bioativas de extratos vegetais no manejo da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*). Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia - PB, 2013.

PINTO, K. M. S.; NASCIMENTO, L. C.; GOMES, E. C. S.; SILVA, H. F.; MIRADA, J. R. Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspect. **European Journal of Plant Pathology**, v.134, n.4, 745-754, 2012.

PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v.96, p.653-656, 2006.

PLOETZ, R. C. ***Fusarium* wilt of banana**. APS Press, St. Paul MN. 1990.

PLOETZ, R. C. **Generacion de la raza Tropical 4 del mal de panamá: Evaluación de riesgo y um plan de acción para evoluar El problema**. Reunion de grupos de interes sobre los riegos de La raza tropical 4 de *Fusarium*, BBTv y otras plagas de musáceas para La región Del Oirsa, Amareica Latina y El Caribe. p.31, 2009.

PLOETZ, R. C. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v.73, p.7-15, 2015.

PUHALLA, J. E. Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In: Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Cook, R. J. (Eds) ***Fusarium: diseases, biology, and taxonomy***. Pennsylvania. State University, p.291-305, 1981.

SANTOS, C. A.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; AND RIBEIRO, H. L. C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.49-55, 2011.

SAROJ, A.; PRAGADHEESH, V. S.; YADAV, A.; SINGH, S. C.; SAMAD, A.; NEGI, A. S.; CHANOTIYA, C. S. Anti-phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. **Crops and Products**, v.74, p.327-335, 2015.

SILVA, C. M.; HINZ, R. H.; STADNIK, M. J.; PEREIRA, A.; TCACENCO, F. A. Diversidade genética por marcadores moleculares em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no estado de Santa Catarina. **Ciência Rural**, v.40, n.12, p.2480-2485, 2010.

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *Aspergillus niger* causador da podridão vermelha em sisal. **Tecno-lógica**, v.17, n.2, p.124-128, 2014.

SOUZA, M. E.; LEONEL, S.; FRAGOSO, A. M. Crescimento e produção de genótipos de bananeiras em clima subtropical. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.581-591, 2011.

SOUZA, W. C. O. **Alternativas de manejo da fusariose do abacaxizeiro “Pérola”** Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia - PB, 2016.

STOVER, R. H. **Banana Plantain and Abaca Diseases**. Commonwealth Mycological Institute, p.316, 1962.

THANGAVELU, R.; MUTHU KUMAR, K.; GANGA DEVI, P.; MUSTAFFA, M. M. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Isolates (*Foc*) of India by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis. **Molecular Biotechnology**, v.51, p.203-211, 2012.

VENTURA, J. A.; HINZ, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: Zambolim. **Controle de doenças de plantas – FRUTEIRAS**. Suprema Gráfica e Editora Ltda. Viçosa, Minas Gerais, v.2, p.839-937, 2002.

VISSER, M.; GORDON, T.; FOURIE, G.; VILJOEN, A. Characterization of South African Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Cavendish Bananas. **South African Journal of Science**, v.106, p.154-156, 2010.

YAHYA, N. A.; ATTANA, N.; WAHABA, R. A. An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v.112, p.69-85, 2018.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

RESUMO

A banana (*Musa* spp.) é a segunda fruta mais produzida no mundo, no entanto, durante o seu cultivo, a bananeira pode ser infectada por vários agentes patogênicos, dentre eles, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), agente causal do mal do Panamá, uma das doenças mais destrutivas da cultura. Assim, o objetivo com o presente estudo consiste na caracterização de isolados de *Foc* associados à bananeira, por meio de morfologia e análise filogenética (Neighbor-Joining) baseada em sequências das regiões TEF (*EF-1a*) e IGS. Para as análises, foram utilizados dois isolados procedentes dos municípios de Areia e Lagoa Seca, no estado da Paraíba, da variedade Maçã (K01 e K10) e seis isolados (CMM-0807-PE, CMM-0813-PE, CMM-1236-BA, CMM-2820-BA, CMM-2910-AL, CMM-2916-AL) que foram cedidos pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para caracterização morfológica, foi realizada cultura monospórica em meio batata-dextrose-ágar e avaliadas a coloração das colônias; diâmetro micelial; índice de velocidade de crescimento micelial e esporulação. Na análise morfológica 50% dos fungos apresentaram coloração roxa, 37,5% branca e 12,5% rosa. Quanto a esporulação, o isolado K01 produziu a maior quantidade de esporos, seguido do CMM-0807. Foram identificados quatro grupos de *F. oxysporum* com linhagens filogenéticas distintas, com 99% de suporte bootstrat. Os isolados K01 da Paraíba e CMM-0807 de Pernambuco, apresentaram maior esporulação.

Palavras-chave: Mal do Panamá, Filogenia molecular, Marcadores morfológicos.

MORPHOLOGICAL AND PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

ABSTRACT

Banana (*Musa* spp.) is the second largest fruit produced in the world, however, during its cultivation banana tree can be infected by several pathogenic agents, as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), causing Panama disease, one of the greatest destructive diseases of the cultivar. Thus, the present research aimed to characterize *Foc* isolated associated to banana tree through phylogenetic and morphological analyses (Neighbor-Joining) based on region sequences TEF (*EF-1a*) and IGS. Two *Foc* isolates from the municipalities of Areia and Lagoa Seca, in the state of Paraíba, cv. Maçã (K01 and K10) and six *Foc* isolates (CMM-0807-PE, CMM-0813-PE, CMM-1236-BA, CMM-2820-BA, CMM-2910-AL, CMM-2916-AL) from the Federal University of Pernambuco were analyzed. For the morphological characterization, monospore culture was performed in potato dextrose agar; the color of the colonies, mycelial diameter, mycelial growth speed index and sporulation were evaluated. In the morphological analyses 50% of fungi presented purple color, 37.5% white color and 12.5% pink color. Regarding sporulation, K01 produced the greatest quantity of spores, followed by CMM-0807. Four groups of *F. oxysporum* were identified with distinct phylogenetic lines, with 99% of bootstrap support. K01 from Paraíba state and CMM-0807 from Pernambuco state presented the highest sporulation.

Keywords: Panama disease, molecular phylogeny, morphological markers.

INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) é uma das frutas mais produzidas e consumidas no mundo, sendo cultivada na maioria dos países tropicais (CUNHA et al., 2015), com alto valor nutritivo e disponibilidade durante todo o ano, dessa forma, apresenta grande importância econômica e social. No Brasil, as condições climáticas (temperatura, umidade relativa, precipitação e insolação) favorecem a constante produção anual da banana, atendendo de forma regular as necessidades de consumo do país (COSTA et al., 2015).

As principais causas de perda da cultura da bananeira são decorrentes a sua alta suscetibilidade ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, a produção é comprometida sendo rapidamente destruído pela doença. Atualmente, a recomendação é de que o produtor não faça novos plantios de cultivares suscetíveis na área infestada, pois é praticamente impossível erradicar o patógeno que pode sobreviver por vários anos na presença ou ausência de plantas hospedeiras (SILVEIRA, 2018).

O mal do Panamá é uma doença endêmica em todas as regiões produtoras de banana do mundo, sendo bastante severa e agressiva ao hospedeiro (SILVA et al., 2013). Essa doença é citada como uma das seis mais importantes de plantas cultivadas, e responsável por perdas econômicas bastante expressivas (COSTA, et al., 2015). O agente causal é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), patógeno que habita o solo e infecta o xilema, induz murcha e causa a morte da planta (STOVER, 1962). Este fungo está disseminado em diferentes condições edafoclimáticas (GARCÍA-BASTIDAS et al., 2014; ORDOÑEZ et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

O *Foc* infecta cultivares de bananeira de vários subgrupos (CUNHA et al., 2015), além disso, devido ao seu elevado potencial de destruição e pelas dificuldades de implementar práticas de manejo, causa grandes prejuízos aos bananicultores (BORGES et al., 2007). Uma das medidas mais eficazes de mitigar os problemas causados pelo *Foc* é utilizar cultivares de bananeiras resistentes (DIAS et al., 2014).

Embora os métodos baseados em morfologia sejam importantes para o diagnóstico de espécies de fitopatógenos, os métodos moleculares são capazes de categorizar em nível de raça (DIAS et al., 2014). A identificação de *Foc* é geralmente baseada em características morfológicas (SANTOS et al., 2011).

De acordo com O'Donnell et al. (1998), *Foc* consiste em várias linhagens clonais que podem ser geneticamente distantes, em que verificaram-se linhagens com origem monofiléticas, comparando as sequências de DNA de genes mitocondriais e nucleares. Ploetz

(2006) afirmou que estudos filogenéticos indicam que *Foc* tem várias origens evolutivas independentes. Dias et al. (2014) avaliando a caracterização de isolados de *Foc* quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil, constatarem correlação significativa entre a compatibilidade vegetativa e a distribuição geográfica no país.

Diante deste cenário, o objetivo com o presente estudo é a caracterização de isolados de *Foc* associados à bananeira, que permitam identificar o agente etiológico de acordo com os conceitos de espécie filogenética e biológica, e assim, gerar sólida base de conhecimento que permita a diagnose e monitoramento do patógeno de forma consistente e confiável.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização e obtenção de isolados

O trabalho foi conduzido em duas partes. (i) caracterização filogenética no Instituto Biológico, São Paulo – SP; (ii) caracterização morfológica realizada no Laboratório de Microbiologia, no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CCAA) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus II, Lagoa Seca, PB.

Para o estudo foram utilizados oito isolados, onde dois foram isolados de pseudocaules provenientes de cultivos comerciais em Areia e Lagoa Seca, no estado da Paraíba; e seis isolados (K01, K10, CMM-0807-PE, CMM-0813-PE, CMM-1236-BA, CMM-2820-BA, CMM-2910-AL, CMM-2916-AL), foram cedidos pela Coleção Micológica de Fungos Fitopatogênicos Maria Menezes, do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, provenientes de regiões produtoras nos estados de Pernambuco, Bahia e Alagoas.

Isolamento e multiplicação do patógeno

Isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos de pseudocaule de bananeira com sintomas típicos do mal do Panamá. Foram retirados fragmentos do pseudocaule (cinco mm de diâmetro) de tecido doente e foram desinfestados com etanol a 70% (60 segundos) e hipoclorito de sódio a 1% (60 segundos), seguidos de lavagem com água destilada autoclavada por 60 segundos, sendo a lavagem realizada por três vezes. Os fragmentos foram colocados em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e acondicionados por sete dias a 25 °C em BOD com fotoperíodo de 12 h. Os isolados foram repicados para novas placas de Petri contendo meio de cultura, purificados e armazenados em condições de refrigeração em temperatura de 24 °C.

Para a obtenção dos isolados purificados, os esporos foram coletados com o auxílio de uma espátula, por meio do corte de fragmentos do meio de cultura com colônia fúngica, que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de ADE, seguindo diluição em série com a transferência de 1 mL (10^1 conídios mL^{-1}) da suspensão de esporos do tubo anterior para outro tubo com o mesmo volume de ADE, até o sexto tubo. No sexto tubo, 1 mL da suspensão de esporos obtida (10^6 conídios mL^{-1}) foi distribuído em placas de Petri contendo 10 mL de ágar-água (AA), que foram incubadas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 12 h ou até a germinação dos esporos (SOUZA et al., 2013).

As culturas monospóricas foram obtidas por meio da coleta de um conídio ao microscópio de luz. O conídio foi coletado pelo corte de um fragmento circular, correspondente ao foco de luz do microscópio, com peça confeccionada a partir de tarugo de bronze, especificamente desenvolvida para este fim. Os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo BDA e incubados por sete dias a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) até o momento do uso ou preservação (SOUZA, 2009; SOUZA et al., 2013). Os isolados monospóricos foram preservados pelo método Castelanni (1939).

Caracterização molecular dos isolados e extração de DNA

Os isolados monospóricos purificados foram cultivados em meio líquido de extrato de malte 2% por três dias, em temperatura ambiente (25 °C) sob agitação de 100 g. O micélio foi filtrado em gaze esterilizada, macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com o uso do kit de extração Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Brasil, São Paulo, BR).

Análise filogenética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Para a análise filogenética, sequências de isolados foram editadas para obter sequências de consenso, utilizando o *Software* SeqAssem (SequentiX, Klein Raden, Germany) e alinhadas utilizando o *Software* MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) para cada região gênica. Por meio do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia - BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) foram pesquisadas sequências suficientemente similares às sequências de interesse, as quais provavelmente partilham um ancestral comum. Após a escolha das sequências para serem incluídas na árvore filogenética, foram baixadas sequências para a plataforma MEGA's Alignment Explorer.

As sequências foram otimizadas manualmente para assegurar homologia posicional, e alinhadas utilizando a ferramenta MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) do MEGA. As lacunas foram tratadas como dados de exclusão de pares e,

quando foram encontradas sequências mais longas que a maioria, depois do alinhamento, o excesso foi removido através do MEGA 6.0 (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Fusarium oxysporum* incluídos na análise filogenética.

Taxon	Designação do isolado*	Hospedeiro	Origem	Número de acesso no GenBank	
				TEF (EF-1 α)	IGS rDNA
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	NRRL 25594	<i>Ipomoea batatas</i>	SC-USA	AY527621	FJ985478
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	NRRL 36135	<i>Ipomoea batatas</i>	-	FJ985332	FJ985565
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	NRRL 36389	<i>Ipomoea batatas</i>	-	FJ985351	FJ985584
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	NRRL 38289	<i>Ipomoea batatas</i>	NC-USA	FJ985368	FJ985601
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	NRRL 38273	<i>Passiflora</i> sp.	Austrália	FJ985362	FJ985595
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	NRRL 22549	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	AF008505	FJ985460
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>aechmeae</i>	NRRL 22533	<i>Aechmea fasciata</i>	Alemanha	AY527622	FJ985449
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	NRRL 32891	<i>Gossypium</i> sp	AR-USA	FJ985317	FJ985550
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	NRRL 32897	<i>Gossypium</i> sp	AR-USA	FJ985318	FJ985551
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	NRRL 31495	<i>Gossypium</i> sp	CA-USA	FJ985306	FJ985539
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	NRRL 25607	<i>Musa</i> ABB ‘Bluggoe’	FL-USA	AF008489	FJ985469
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	NRRL 36114	<i>Musa</i> AAB ‘Pisang Manurung’	Indonésia	FJ985328	FJ985561
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	NRRL 36102	<i>Musa</i> AAA ‘Cavendish’	Taiwan	FJ985325	FJ985558
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	NRRL 36110	<i>Musa</i> AAA ‘Cavendish’	Austrália	FJ985327	FJ985560
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	NRRL 25603	<i>Musa</i> AAA ‘Cavendish’	Austrália	AF008487	FJ985480
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	NRRL 26029	<i>Musa</i> AAB ‘Silk’	FL-USA	AF008493	FJ985483
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	NRRL 36107	<i>Musa</i> AAB ‘Maqueno’	Honduras	FJ985326	FJ985559
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>zingiberi</i>	NRRL 26449	<i>Zingiber</i> sp.	SC-USA	FJ985301	FJ985509
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Conglutinans</i>	NRRL 53158	<i>Brassica oleracea</i> (cabbage)	NC-USA	FJ985443	FJ985678
<i>Fusarium commune</i> strain	NRRL 38296	<i>Beta vulgaris</i>	CA-USA	FJ985372	FJ985605
<i>Fusarium commune</i> strain	NRRL 53153	-	Korea	FJ985440	FJ985675

* Sequences were retrieved from the GenBank database and used as reference sequences. NRRL = Northern Regional Research Laboratory, NCAUR, Peoria IL, USA.

Os genes TEF e IGS (Tabela 2) relatado em O'Donnell et al. (1998, 2009) foram utilizados para a análise dos isolados. Uma árvore filogenética (Figura 1), foi obtida por meio da análise Neighbor-Joining (NJ) a partir do alinhamento obtido para os oito isolados de *Fusarium* em estudo, incluindo 21 sequências obtidas do GenBank.

A estabilidade dos clados na árvore resultou do modelo da máxima parcimônia avaliado por meio da análise *bootstrat* com 1000 repetições, e os respectivos valores de *bootstrat* foram mostrados em cada nó. Espécies de isolados de *Fusarium commune* foram utilizadas para enraizar a árvore.

Tabela 2. *Primers* utilizados no estudo.

Gene	Primers	Fonte
TEF	EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3')	O'Donnell et al. (1998)
(EF-1 α)	EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3')	
IGS	NL11 (5'- CTGAACGCCTCTAAGTCAG -3')	Aoki et al. (2003)
rDNA	CNS1 (5'- GAGACAAGCATATGACTAC -3')	

Caracterização morfológica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Para a caracterização morfológica os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA e incubados à temperatura ambiente de 25 ± 2 °C, sendo realizadas três repetições de cada isolado. Foram depositados discos contendo micélio com 5 mm no centro da placa de Petri com 15 mm. As avaliações de crescimento micelial, coloração da colônia e esporulação ocorreram após 48, 72, 96, 120 e 144 h de incubação.

O crescimento micelial foi mensurado com o auxílio de uma régua milimetrada (SUMMERELL; LESLIE, 2003) após 48, 72, 96, 120 e 144 h de incubação, da medição. O Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi estimado utilizando a metodologia sugerida Oliveira (1991), pela Equação (1).

$$\text{IVCM} = (\text{D}-\text{Da})/\text{N}$$

Em que, IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial; D = diâmetro médio atual da colônia; Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de dias após a inoculação em placa de Petri.

Com relação à avaliação da esporulação, foi realizada em isolados crescidos sobre os meios de cultura BDA em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante o período de 2-7 dias de incubação. A contagem de esporos foi realizada em suspensão contendo 10 mL de ADE adicionados às placas de Petri com as colônias fúngicas. Os esporos foram liberados pela raspagem da colônia com auxílio de uma escova de cerdas macias. A

suspensão de esporos foi filtrada em dupla camada de gaze esterilizada e a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Teste de agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

O teste de agressividade foi realizado para obtenção dos isolados mais virulentos em mudas de bananeira da variedade Pacovan. As mudas foram obtidas da área experimental do CCAA-UEPB, Campus II de Lagoa Seca - PB cultivadas em casa de vegetação em sacos de polietileno com solo e esterco bovino (3:1), durante o período de 90 dias que registraram a temperatura média de 25 °C. A irrigação foi feita diariamente com o auxílio de um regador manual.

A inoculação foi realizada de acordo com Dita et al. (2010), em que o rizoma (10 cm) da bananeira foi desinfestado com hipoclorito a 1%, depois de 24 h, foi feita a inoculação separadamente para cada isolado, sendo realizados quatro perfurações utilizando bisturi esterilizado no rizoma com uma profundidade de 3 cm, em seguida, foram imersos na suspensão de esporos ajustada para 10^6 conídios mL⁻¹ do inóculo por 10 minutos, depois retirados e colocados em sacos de polietileno com os substratos.

Cada unidade experimental foi representada por uma muda. O delineamento experimental foi utilizado três repetições para cada isolado; e a avaliação foi feita após 90 dias da inoculação (DAI), através de escala de notas proposta por Rodriguez et al. (2014). Os isolados utilizados foram K01, CMM-0807, CMM-2820, CMM-2916.

Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$), e no caso de significância, os tratamentos foram analisados pela análise de regressão. Para estas análises utilizou-se o *software* estatístico R[®] (Core Team R, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise filogenética baseada nos genes TEF e IGS, compreendeu 1.162 caracteres depois do alinhamento, cujos limites foram: TEF 1 - 635 e IGS 636 - 1.162. Foram envolvidas 44 sequências depositadas no Genbank para cada um dos genes TEF e IGS, e sequências dos oito isolados em estudo, o que permitiu a seleção do subconjunto de 29 isolados utilizados para a análise filogenética.

A análise Neighbor-Joining (NJ) revelou a existência de quatro grupos de *F. oxysporum* em estudo, identificados como linhagens filogenéticas distintas. Destes,

apenas um isolado (CMM 0807) foi agrupado como espécie de *Foc*, com 99% de suporte *bootstrat*.

Além deste, o isolado CMM 2916 foi agrupado com espécies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *F. oxysporum* f. sp. *passiforae* e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com suporte *bootstrat* de 99%. Dois isolados (CMM 1236 e CMM 2820), constituíram uma espécie desconhecida (95% de suporte *bootstrat*), formando um clado irmão da espécie descrita como *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Os outros isolados (CMM 2910, PB 01, CMM 0813 e PB 02) foram obtidos como uma espécie filogenética desconhecida, embora tenham um suporte *bootstrat* baixo (51%) como observado na Figura 1.

Os resultados apresentados demonstram que existem várias espécies ou formas de *F. oxysporum* associadas com a cultura da bananeira, e que podem ser definidas como linhagens filogenéticas distintas no complexo *F. oxysporum*. Por meio da análise Neighbor-Joining (NJ), foram caracterizados quatro taxons no complexo, o que suporta os resultados obtidos por outros autores (O'DONNELL et al., 1998; COSTA et al., 2015; MUHAMMAD et al., 2017; MARYANI et al., 2019).

O entendimento da caracterização e identificação de espécies no complexo *F. oxysporum* tem sido revolucionado através da filogenia molecular (O'DONNELL et al., 2009; MUHAMMAD et al., 2017; MARYANI et al., 2019). No entanto, muitas espécies anteriormente descritas como *F. oxysporum* continuam desconhecidas, embora um número significativo já tenha sido identificado por O'Donnell et al. (2009) e Muhammad et al. (2017), sob ponto de vista de diversidade e distribuição.

Neste estudo, a maioria dos isolados (CMM 1236, CMM 2820, CMM 2910, PB 01, CMM 0813 e PB 02) foi descrita como linhagens filogenéticas desconhecidas. Foram identificadas representantes de diferentes *formae speciales*, porém, os resultados sugerem a necessidade de aumento do tamanho da amostra, com ampla distribuição geográfica, bem como o uso de genes adicionais com vista ao aprimoramento das inferências na caracterização de espécies de *F. oxysporum* como referido em Maryani et al. (2019).

Variações de *F. oxysporum* tidas como filogeneticamente distintas, foram descritas como agentes causais do mal do Panamá da bananeira (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1981).

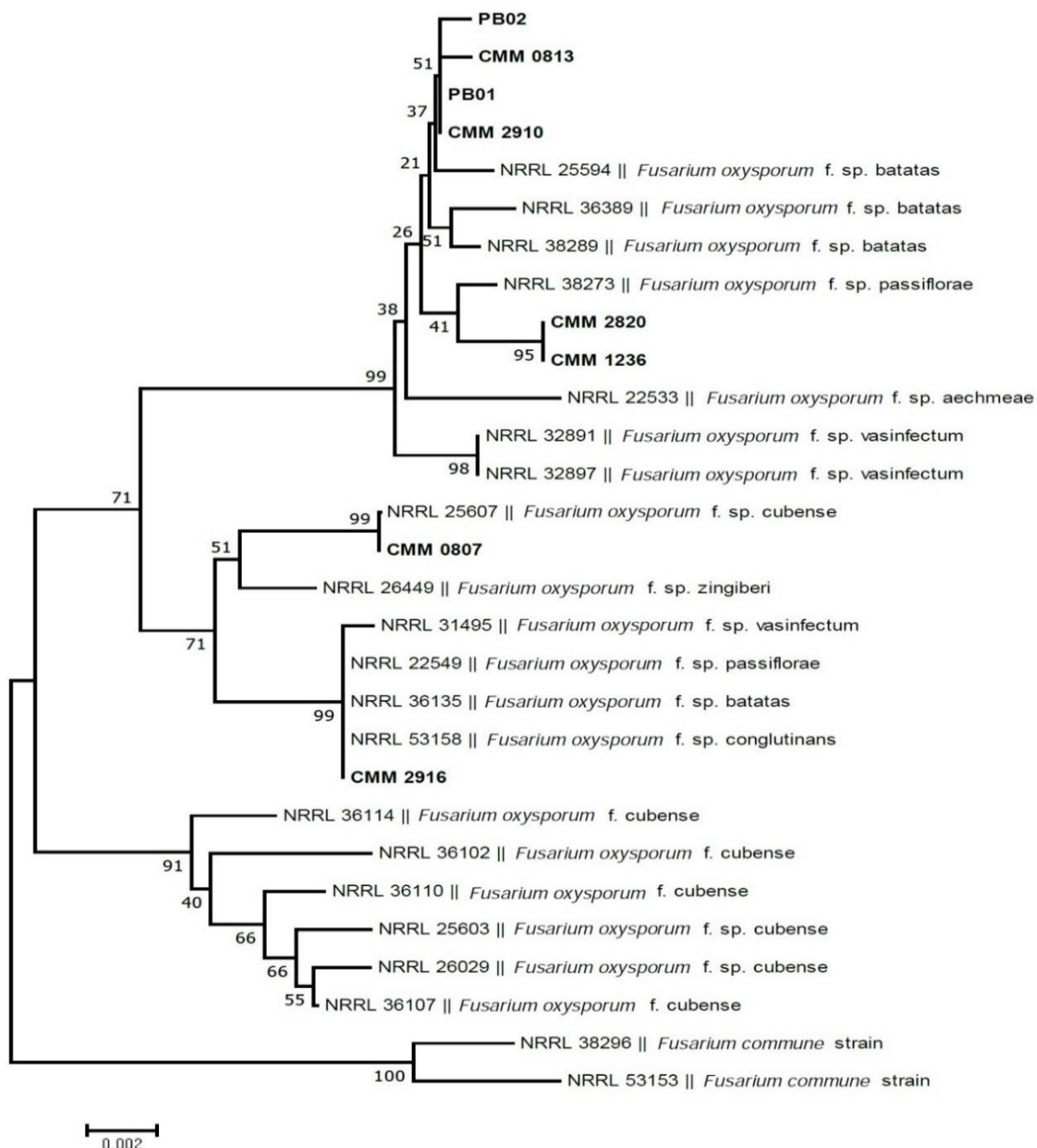


Figura 1. Árvore filogenética obtida por meio da análise Neighbor-Joining (NJ) baseada nos genes TEF e IGS para 29 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, oito das quais sequenciadas neste estudo. A barra de escala indica o número de mudanças esperadas por locus.

De acordo com os dados obtidos a partir da análise morfológica, constatou-se que quatro isolados apresentaram coloração roxa, três rosa e uma branca, na parte anterior

da placa de Petri. Já no verso, foi observada a coloração de cinco colônias brancas e três roxas (Tabela 3).

Tabela 3. Origem e coloração da colônia *in vitro** de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Lagoa Seca, PB, 2019.

Isolados	Origem	Coloração	
		Frente	Verso
K01(PB)	Paraíba	Roxo	Roxo
K10 (PB)	Paraíba	Rosa	Branco
CMM-0807	Pernambuco-PE	Rosa	Branco
CMM-0813	Pernambuco-PE	Roxo	Roxo
CMM-2820	Bahia-BA	Rosa	Branco
CMM-1236	Bahia-BA	Branco	Branco
CMM-2910	Alagoas-AL	Roxo	Branco
CMM-2916	Alagoas-AL	Roxo	Roxo

*Fungos cultivados em BDA, após sete dias de incubação

A caracterização morfológica dos isolados de *Foc* é importante para demonstrar a variabilidade da coloração da colônia fúngica. Neste sentido, Silva (2009) caracterizou a diversidade genética de 66 isolados de *Foc* coletados em Santa Catarina, sendo verificadas diferentes colorações dos isolados.

De posse dos dados obtidos a partir da análise de variância, constatou-se que houve diferença mínima significativa pelo teste Fischer ($p < 0,001$) para o crescimento micelial de isolados de *F. oxysporum* avaliados, bem como no seu crescimento em função dos dias de avaliação. Constatou-se ainda que, não houve interação significativa entre os isolados e os dias de avaliação. Na sequência foi realizada a avaliação do efeito de cada isolado por meio do teste de Tukey, o qual possibilitou o desdobramento de cada isolado dentro de cada dia de avaliação (Tabela 4).

Tabela 4. Crescimento micelial de isolados de *Fusarium* em BDA em função do tempo em dias. Areia, PB, 2019.

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Isolados (I)	7	14.151	2.0215	65.8745***
Dias (D)	4	32.622	8.1554	265.7563***
Interação I x D	28	1.056	0.0377	1.2295
Resíduo	80	2.455	0.0307	
C.V: 6,3%				

F.V: Fontes de Variação; G.L: Graus de Liberdade; SQ: Soma dos Quadrados; QM: Quadrados Médios; F: Fischer; ***significativo a <1% pelo teste de Fischer; C.V: Coeficiente de Variação.

No primeiro dia de avaliação do crescimento micelial foi verificado que os isolados CMM-2820, CMM-0807 e CMM-0813 foram estatisticamente iguais entre si e diferentes dos isolados K01, CMM-2916, CMM-1236, K10 e CMM-2910. Verificou-se também que K01, CMM-2916, CMM-1236, K10 foram estatisticamente iguais e o K01 foi diferente apenas de CMM-2910. Os efeitos observados no primeiro dia de avaliação se repetiram ao longo das demais avaliações. CMM-2916 nos demais dias de avaliação (2, 3, 4, e 5) apresentou crescimento diferente de K01, que manifestou-se semelhante no primeiro dia (Tabela 5).

O isolado CMM-2920 possui o menor crescimento micelial no primeiro dia de avaliação e CMM-1236 nos demais períodos. O maior crescimento micelial observado foi para CMM-2820 e CMM-0807 que não apresentaram diferença estatística (Tabela 5).

Tabela 5. Crescimento micelial de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in vitro em função do tempo em dias. Lagoa Seca, PB, 2019.

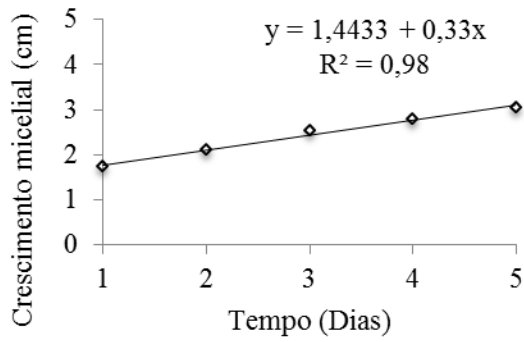
Isolados	Dias de avaliação				
	1	2	3	4	5
CMM-2820	2.00 a	2.25 a	2.66 ab	3.00 a	3.13 a
CMM-0807	2.00 a	2.25 a	2.85 a	3.08 a	3.33 a
CMM-0813	1.73 ab	2.10 ab	2.53 ab	2.80 ab	3.05 a
K01	1.48 bc	2.36 a	2.75 a	3.00 a	3.05 a
CMM-2916	1.11 cd	1.76 bc	2.28 bc	2.51 bc	2.93 ab
CMM-1236	1.10 cd	1.55 c	1.90 c	2.15 c	2.41 c
K10	1.05 cd	1.65 c	2.03 c	2.31 c	2.56 bc
CMM-2910	0.800 d	1.55 c	1.98 c	2.25 c	2.50 bc

As médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

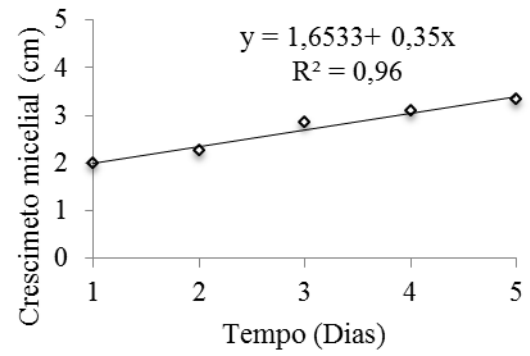
Os efeitos de cada isolado de *Foc* segue uma tendência de crescimento do menor para o maior, entretanto, mesmo partindo dessa inferência, fez-se necessário a verificação do comportamento de cada isolado em função do tempo em dias, pois houve um efeito significativo e as médias ajustaram-se ao modelo de regressão linear crescente (Figura 2). Estes modelos crescentes foram altamente confiáveis, visto que se obtiveram coeficientes de determinações (R^2) aceitáveis nas normas estatísticas de análise de dados.

Os isolados CMM-0813 ($R^2 = 0,98$), CMM-0807 ($R^2 = 0,96$); K10 ($R^2 = 0,96$); CMM-1236 ($R^2 = 0,98$); CMM-2820 ($R^2 = 0,97$); CMM-2910 ($R^2 = 0,94$) e CMM-2916 ($R^2 = 0,97$) tiveram coeficientes de determinação com ótima capacidade preditiva $p < 0,01$ e com boa capacidade preditiva o isolado K01 ($R^2 = 0,85$) $p < 0,05$, conforme pode ser observado na Figura 2 (A-H).

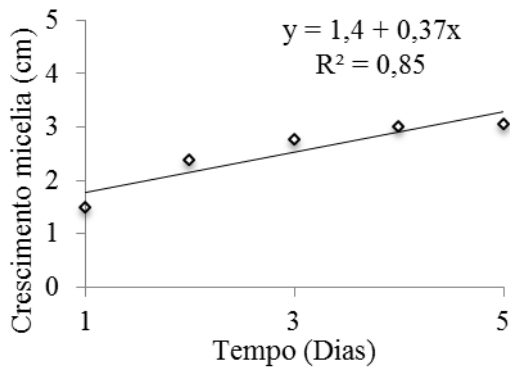
A)



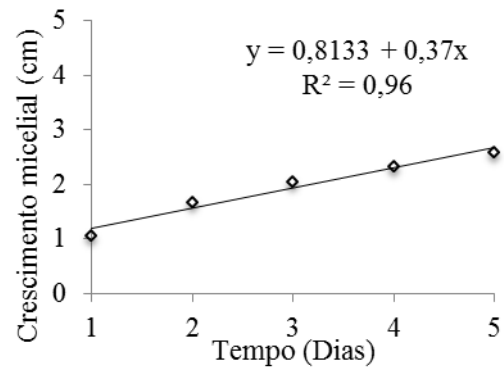
B)



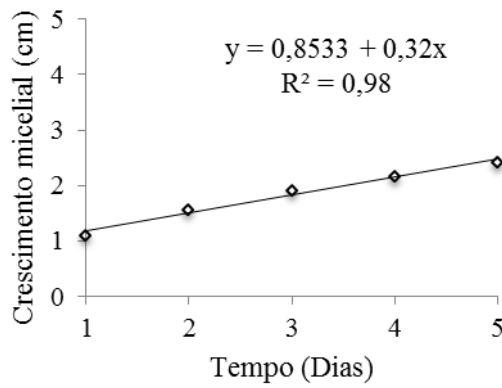
C)



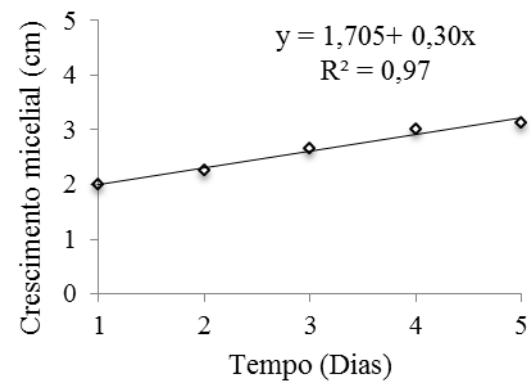
D)



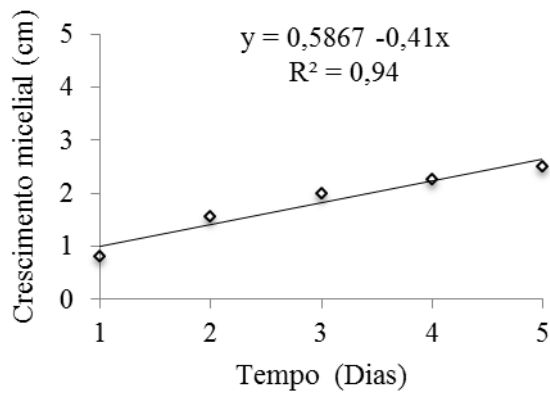
E)



F)



G)



H)

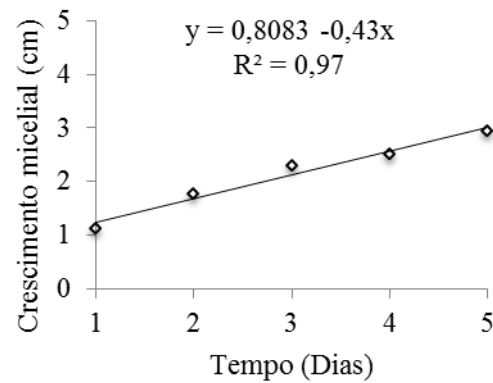


Figura 2. Crescimento micelial dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *in vitro* em função dos dias de avaliação. Isolados: CMM-0813 (A); CMM-0807 (B); K01 (C); K10 (D); CMM-1236 (E); CMM-2820 (F); CMM-2910 (G) e CMM-2916 (H).

O isolado que apresentou maior taxa de crescimento foi CMM-0807 (Figura 2B). Observando-se ainda na Figura 2, percebem-se acréscimos de 43% para o isolado CMM-0813 (2A); 51% para o isolado K01 (2C); 59% para K10 (2D); 54% para CMM-1236 (2E); 33% para o isolado CMM-2810 (2F); 68% para o isolado CMM-2910 (2G) e 62% para o isolado CMM-2916 (2H), aos cinco dias de avaliação quando comparado ao do primeiro dia de avaliação. Embora os maiores crescimentos tenham ocorrido para CMM-2820 e CMM-0807, o maior incremento no crescimento micelial foi constatado para CMM-2910 e CMM-2916, conforme descrito anteriormente (Figura 2G e 2H).

Para Ghini et al. (2011) devido ao *Foc* ser naturalmente um habitante do solo, haverá sempre diferenças significativas entres isolados de diferentes distribuições geográficas e temporais, visto que cada organismo responde biologicamente de forma diferente, corroborando com os resultados dessa pesquisa. Esta afirmativa é confirmada também por Silva et al. (2013), quando verificaram aumento crescente no crescimento micelial de *Foc* aos 3, 7 e 11 dias após o pareamento do fungo com espécies de actinobactérias.

Nessa perspectiva, para melhor compreensão do crescimento micelial, fez-se necessário calcular também o índice velocidade de crescimento micelial de isolados de *F. oxysporum* em BDA em função do tempo em dias. A partir da análise de variância, verificou-se efeito significativo entre os isolados ($p < 0,01$) de *F. oxysporum*, nos dias de avaliação ($p < 0,001$), bem como na interação entre os isolados e os dias da avaliação ($p < 0,001$). O índice de velocidade de crescimento micelial de isolados de *F. oxysporum* em BDA em função do tempo em dias, apresentou diferença mínima significativa apenas na primeira e segunda avaliação (Tabela 6).

Tabela 6. Índice de Velocidade de crescimento micelial de isolados de *Fusarium* em BDA em função do tempo em dias. Areia, PB, 2019.

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Isolados (I)	7	0.02339	0.003342	3.3114**
Dias (D)	4	0.86861	0.217153	215.1804***
Interação I x D	28	0.21096	0.007534	7.4659***
Resíduo	80	0.08073	0.001009	
C.V: 22%				

F.V: Fontes de Variação; G.L: Graus de Liberdade; SQ: Soma dos Quadrados; QM: Quadrados Médios; F: Fischer; *** e ** significativo a <1% e 5% pelo teste de Fischer, respectivamente; C.V: Coeficiente de Variação.

Na primeira avaliação, CMM-2820, CMM-0807 e CMM-0813 foram estatisticamente iguais, sendo diferentes de CMM-2916, CMM-1236, K10 e CMM-2910. Percebe-se também, que CMM-0813 é estatisticamente igual ao K01, sendo este último igual à CMM-2916 e CMM-1236 (Tabela 7).

Na segunda avaliação, observaram-se diferenças significativas, onde o maior crescimento foi verificado para K01 e CMM-2910 não tendo diferença estatística entre si, os quais foram diferentes de CMM-2820 e CMM-0807 (Tabela 7).

Tabela 7. Índice de velocidade de crescimento micelial dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in vitro em função do tempo (dias). Lagoa Seca, PB, 2019.

Isolados	Dias de avaliação				
	1	2	3	4	5
CMM-2820	0.40 a	0.05 c	0.08 a	0.06 a	0.06 a
CMM-0807	0.40 a	0.05 c	0.12 a	0.04 a	0.05 a
CMM-0813	0.34 ab	0.07 bc	0.08 a	0.05 a	0.05 a
K01	0.29 bc	0.17 a	0.07 a	0.05 a	0.04 a
CMM-2916	0.22 cd	0.13 abc	0.10 a	0.04 a	0.08 a
CMM-1236	0.22 cd	0.09 bc	0.07 a	0.05 a	0.05 a
K10	0.21 d	0.12 abc	0.07a	0.05 a	0.05 a
CMM-2910	0.16 d	0.15 ab	0.08 a	0.05 a	0.05 a

As médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Diferentemente dos dados de crescimento micelial, o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) não seguiu unicamente uma tendência linear, assim sendo, fez-se necessário à verificação do comportamento polinomial de cada isolado em relação ao IVCM (Figura 3).

Verificou-se que CMM-0813, CMM-0807 e CMM-2820 de *Foc* seguiram o mesmo padrão para o índice de crescimento micelial, em que suas médias ajustaram-se ao modelo de regressão polinomial quadrática (Figura 3A, 3B e 3F, respectivamente). Percebeu-se que, com essa tendência as médias IVCM decresceram do primeiro dia de avaliação para o segundo dia, proporcionando um leve aumento na terceira avaliação. Estes modelos apresentaram coeficientes de determinações (R^2) confiáveis, pois foram significativos ($p < 0,05$), sendo estes coeficientes de 0,85 para o isolado CMM-0813 (Figura 3A), 0,77 para o CMM-0807 (Figura 3B) e 0,80 para o isolado CMM-2820 (Figura 3F).

Os decréscimos observados no ICM foram de 87,5, 79,5 e 87,5% para CMM-0807 (Figura 3A); CMM-08013 (Figura 3B) e CMM-2820 (Figura 3F), respectivamente, em relação à primeira avaliação para a segunda. Já os acréscimos observados a partir da segunda avaliação para a terceira foram de 58, 12,5 e 37,5% para CMM-0807 (Figura 3A); CMM-08013 (Figura 3B) e CMM-2820 (Figura 3F), respectivamente. Por outro lado, as médias de K01, K10, CMM-1236 e CMM-2916 se ajustaram ao modelo de regressão linear com boa capacidade preditiva ($p < 0,05$) e o CMM-2910 com ótima capacidade preditiva ($p < 0,01$) conforme observa-se na Figura 3.

Houve diminuição acentuada no índice de velocidade de crescimento micelial. Esta diminuição foi de 86% para K01 (Figura 3C); 76% para o K10 (Figura 3D); 77% para CMM-1236 (Figura 3E); 68% para CMM-2910 (Figura 3G) e 81% para CMM-2916 (Figura 3H), quando comparadas a primeira avaliação com a última.

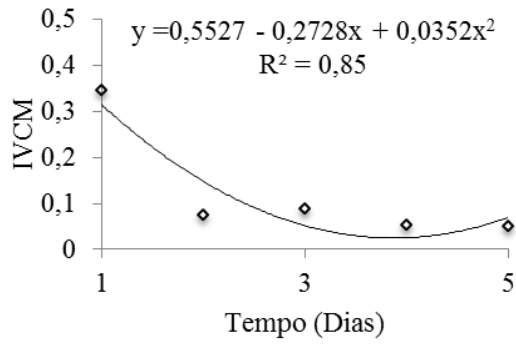
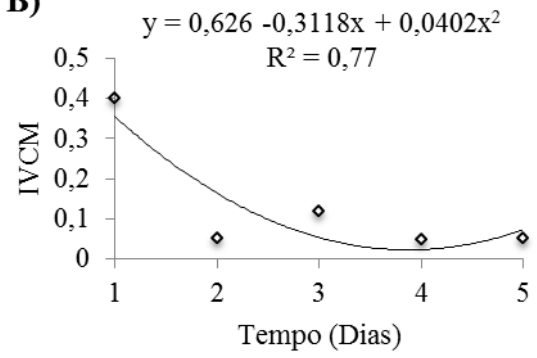
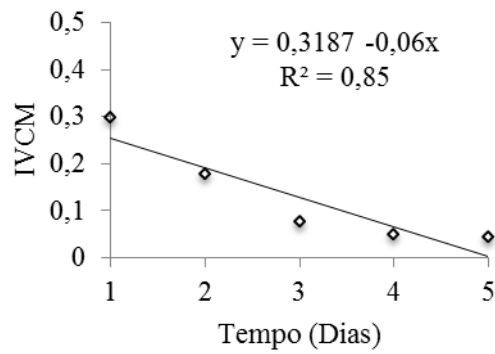
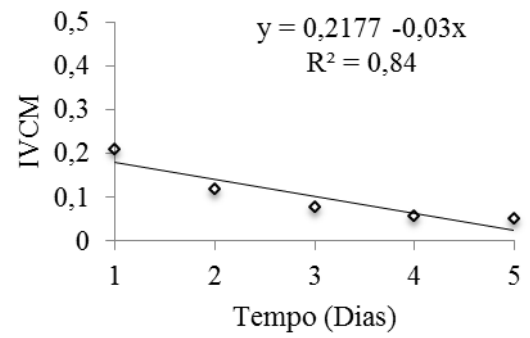
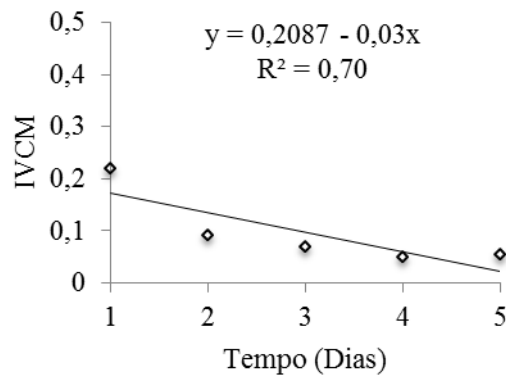
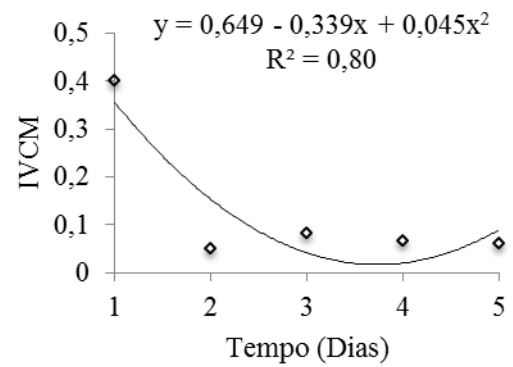
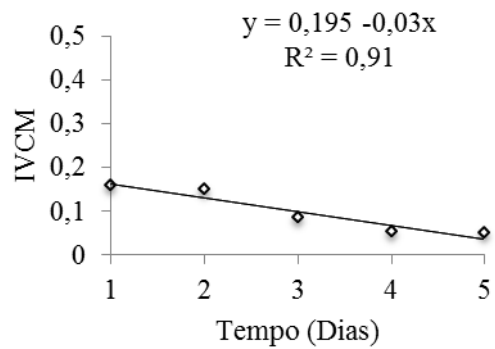
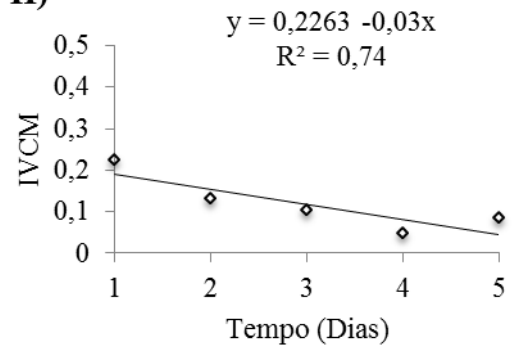
A)**B)****C)****D)****E)****F)****G)****H)**

Figura 3. Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *in vitro* em função dos dias de avaliações. Isolados: CMM-0813 (A); CMM-0807 (B); K01 (C); K10 (D); CMM-1236 (E); CMM-2820 (F); CMM-2910 (G) e CMM-2916 (H).

O índice de velocidade de crescimento micelial das colônias (IVCM), acondicionadas em estufa BOD em ± 25 °C, e avaliado diariamente variaram de uma cultura para outra. Foi observado por Veloso (2013) e Pizzeta (2017) um índice de crescimento micelial aproximado aos observados neste trabalho, o qual verificou-se $1,20 \text{ cm dia}^{-1}$ para os isolados de para *F. oxysporum* de 1,1 e $1,45 \text{ cm dia}^{-1}$, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Wlaker et al. (2016), em que os índices médios de alguns isolados se ajustaram a um modelo de regressão polinomial quadrática, o que também aconteceu nessa pesquisa. Estes autores verificaram crescimento máximo de 0,84 e 0,77 cm para os isolados de *F. acuminatum* e *F. verticillioides*, respectivamente, após 48 h de incubação.

De acordo com os dados obtidos a partir da análise de variância, constatou-se efeito significativos ($p < 0,001$) pelo teste de F de Fischer entre os isolados de *Foc* para a variável esporulação de conídios. Dos isolados de *Foc*, a maior produção média de esporos ($\times 10^6$ conídios mL^{-1}) foi observada com K01 (9,8), seguido de CMM-0807 (6,0), CMM-2810 (4,4), CMM-2916 (4,4), CMM-2910 (4), K10 (4), CMM-1236 (3,8) e CMM-08013 (3,5).

Os isolados K01 e CMM-0807 foram estatisticamente diferentes entre si e dos demais (Figura 4). Por outro lado, CMM-2820, CMM-2916, CMM-2910 e K10 não tiveram diferenças estatísticas entre si, onde CMM-2820 e CMM-2916 foram diferentes de CMM-1236 e CMM-08013 (Figura 4).

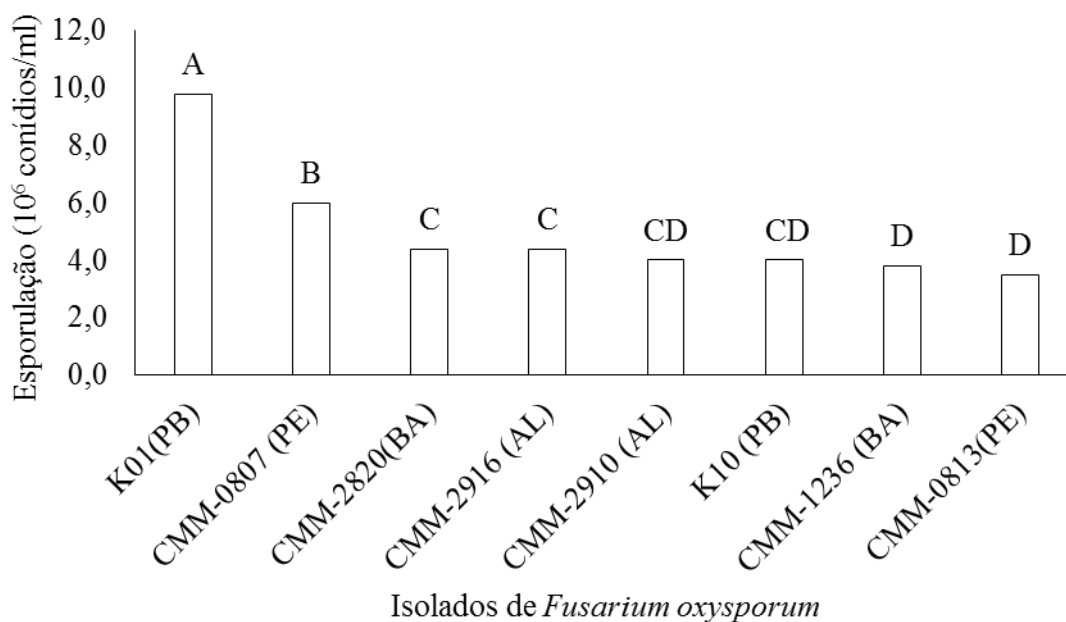


Figura 4. Esporulação de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *in vitro*, à 25 ± 2 °C, após sete dias de incubação. Lagoa Seca, PB, 2019.

Embora o isolado K01 (Paraíba) não tenha apresentado o maior crescimento micelial e velocidade de crescimento micelial, o isolado CMM-2916, teve o maior índice de velocidade de crescimento micelial, não apresentou esporulação satisfatória, visto que produziu apenas $4,4 \times 10^6$ conídios mL^{-1} (Figura 4). Souza et al. (2017) observaram que a origem de isolados de *Foc* influenciou na atividade antagônica de bactérias endofíticas em bananeira.

A esporulação é um processo pelo qual se pode observar a diferenciação mais específica de cada isolado, que por sua vez, estão envolvidas as células reprodutivas afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Estudos sobre a produção de esporos de *Foc* são importantes, pois todas as espécies de *Fusarium* possuem um estágio saprofítico e são habitantes comuns do solo. Costa et al. (2015) relatam ainda que, estes, uma vez introduzidos no solo, persistem quase que indefinidamente na forma de micélio em restos culturais ou como esporos dormentes (clamidósporos), assim dificultando a prevenção e controle do mal do Panamá nos mais diversificados cultivos, inclusive na bananeira.

CONCLUSÕES

A análise Neighbor-Joining (NJ) identificou quatro grupos de *F. oxysporum* com linhagens filogenéticas distintas, com 99% de suporte *bootstrat*.

Os isolados não diferenciaram quanto ao crescimento micelial.

Os isolados que tiveram maior esporulação nas condições estudadas foram K01 (Paraíba) e CMM-0807 (Pernambuco).

Os resultados obtidos também mostram que todos os isolados de *Foc* seguiram o mesmo padrão de crescimento micelial, em que K01 da Paraíba e CMM-0807 de Pernambuco aumentaram o crescimento micelial e o índice de crescimento micelial ao longo do período de avaliação, além de apresentarem maior esporulação.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. Ed. UFV. 2007.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; HOMMA, Y.; LATTANZI, A. R. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex - *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. **Mycologia**, v.95, p.660-684, 2003.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. (Eds.). **Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy**. University Park. Pennsylvania State. p.391-399. University Press. 1981.

BORGES, A. J. S.; TRINDADE, A. V.; MATOS, A. P.; PEIXOTO, M. F. S. Redução do mal-do-Panamá em bananeira-Maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.1, p.35-41, 2007.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42, n.225-226, 65-72, 1939.

COSTA, S. N.; BRAGANCA, C. A. D.; RIBEIRO, L. R.; AMORIM, E. P.; OLIVEIRA, S. A. S.; DITA, M. A.; LARANJEIRA, F. F.; HADDAD, F. Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different regions from Brazil, **Plant Pathology**, v.64, p.137-146, 2015.

CUNHA, C. M. S.; HINZ, R. H.; PEREIRA, A.; TCACENCO, F. A.; PAULINO, E. C.; STADNIK, M. J. A SCAR marker for identifying susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana. **Scientia Horticulturae**, v.191, p.108-112, 2015.

DIAS, S. A.; ABREU, S.; RESENDE, L. V. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil. **Biota Amazônia**, v.4, n.4, p.60-65, 2014.

DITA, M. A.; WAALWIJK, C.; BUDDENHAGUEN, I. W.; SOUZA, M. T.; KEMA, G. H. J. A molecular diagnosis for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. **Plant Pathology**, v.59, p.348-357, 2010.

GARCÍA-BASTIDAS, F.; ORDÓÑEZ, N.; KONKOL, J.; AL-QASIM, M.; NASER, Z.; ABDELWALI, M.; SALEM, N.; WAALWIJK, C.; PLOETZ, R. C.; KEMA, G. H. J. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 associated with panama disease of banana outside southeast Asia. **Plant Disease**, v.98, p.1-5, 2014.

GHINI, R.; BETTIOL, W.; HAMADA, E. Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives. **Plant Pathology**, v.60, n.1, p.122-132, 2011.

MARYANI, N.; LOMBARD, L.; POERBA, Y. S.; SUBANDIYAH, S.; CROUS, P. W.; KEMA, G. H. J. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. **Studies in Mycology**, v.92, p.155-194, 2019.

MUHAMMAD, A.; HUSSAIN, I.; KHANZADA, K., A.; KUMAR, L.; ALI, M.; YASMIN, T.; HYDER, M. Z. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (foc) tropical race 4 causing panama disease in cavendish banana in Pakistan. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v.54, p.1-8, 2017.

O'DONNELL, K.; GUEIDAN, C.; SINK, S.; JOHNSTON, P. R.; CROUS, P. W.; GLENN, A.; RILEY, R.; ZITOMER, N. C.; COLYER, P.; WAALWIJK, C. VAN DER LEEF, T.;

MORETTI, A.; KANG, S.; KIM, H.-S.; GEISER, D. M.; JUBA, J. H.; BAAYEN, R. P.; CROMEY, M. G.; BITHELL, S.; SUTTON, D. A.; SKOVGAARD, K.; PLOETZ, R.; KISTLER, H. C.; ELLIOTT, M.; DAVIS, M.; SARVER, B. A. J. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v.46, n.12, p.936-948, 2009.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.2044- 2049, 1998.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 1991.

ORDOÑEZ, N.; GARCIA-BASTIDAS, F.; LAGHARI, H. B.; AKKARY, M. Y.; HARFOUCHE, E. N.; al-AWAR, B. N.; KEMA, G. H. J. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 causing panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon. **Plant Disease**, v.86, p.1495-1499, 2015.

PIZZETA, M. Caracterização de *Fusarium decemcellulare*, *F. oxysporum* e *F. incarnatum* em seringueira no estado de São Paulo, resistência clonal e sensibilidade a fungicidas. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP, 2017.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v.96, p.653-656, 2006.

RODRIGUEZ, M. A. D.; VICENTE, L. P.; MARTÍNEZ, E. **Inoculation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causal agent of fusarium wilt in banana**. Food and agriculture organization of the united nations (FAO). 2014.

SANTOS, T. M.; COSTA, M. R.; XAVIER, A. A.; NIETSCH, S.; FERNANDES, T. P.; PEREIRA, G. V. N. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp.

Cubense obtidos de bananais do norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.2, p.437-445, 2011.

SILVA, C. M. Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no estado de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2009.

SILVA, J. S.; COIMBRA, J. L.; TAVARES, D. G.; AFONSO, G. O. Inibição *in vitro* do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano. **Natureza online**, v.11, n.1, p.15-19, 2013.

SILVEIRA, F. A. Severidade do mal-do-panamá da bananeira ‘maçã’ em função de biofertilizantes e isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2018.

SOUZA, G. L. O. D; SILVA D. F.; NIETSCH, S.; XAVIER, A. A.; PEREIRA, M. C. T. Bactérias endofíticas como bioinoculantes para mudas micro propagadas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.39, n.2, p.1-10, 2017.

SOUZA, B. O. Manejo da antracnose do sorgo por meio da diversificação da resistência genética na população do hospedeiro. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2009.

SOUZA, B. O.; CASELA, C. R.; NUNES, J. A.; CASTRO, H. A. Management of sorghum anthracnose through diversification of genetic resistance in host population. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.1, p.20-27, 2013.

STOVER, R. H. **Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other Musa species**. Commonwealth Mycological. Institute, Kew, Surrey, England, 117p. 1962.

SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F. A Utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, v.87, p.117-128, 2003.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.12, p.2725-2729, 2013.

VELOSO, J. S. Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal do Pernambuco, Recife - PE, 2013.

WALKER, C.; MACIEL, C. G.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B.; MEZZOMO, R.; POLLET, C. S. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, v.26, n.2, p.463-473, 2016.

ZHANG, L.; YUAN, T.; WANG, Y.; ZHANG, D.; BAI, T.; XU, S.; WANG, Y.; TANG, W.; ZHENG, S.-J. Identification and evaluation of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in *Musa acuminata* Pahang. **Euphytica**, v.214, p.105-116, 2018.

CAPÍTULO III

MANEJO DO MAL DO PANAMÁ COM EXTRATO DE ALHO

RESUMO

O mal do Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) é uma das principais doenças que incidem nas plantações de bananeira, causando elevados prejuízos econômicos. A utilização de extratos vegetais é uma alternativa para inibir o desenvolvimento do patógeno e controlar a doença. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a ação fungitóxica do extrato aquoso de alho sobre *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e o efeito quanto a incidência e severidade do mal do Panamá em mudas de bananeira Pacovan. A avaliação da fungitoxicidade foi realizada em delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos arranjados em esquema fatorial 5 x 2, correspondendo a cinco concentrações do extrato de alho ($C_1 = 0$; $C_2 = 2,5$; $C_3 = 5$; $C_4 = 7,5$ e $C_5 = 10\%$) e dois isolados de *Foc* (K01 e CMM-0807). Avaliações do crescimento micelial foram realizadas com régua graduada em mm após 48, 72, 96, 120 e 144 h da deposição do disco com a cultura do patógeno em meio BDA. Para a avaliação da intensidade do mal do Panamá, mudas de bananeira da cultivar Pacovan foram inoculadas por meio da imersão em suspensão de esporos do patógeno ajustada para 10^6 conídios mL^{-1} por 5 minutos e tratados com extrato de alho. O efeito das concentrações de extrato de alho sobre a severidade do mal do Panamá foi avaliado aos 90 dias após a inoculação, por meio de escala de notas de 1 a 5. Verificou-se a redução do crescimento micelial dos isolados K01 e CMM-0807 de *Foc* testados, sendo que a redução do crescimento micelial foi eficiente com o aumento das concentrações do extrato de alho. A avaliação relacionada a severidade da doença dos isolados K01 e CMM-0807 apresentaram melhores resultados quando comparados aos isolados CMM-2820 e CMM-2916. Com esses resultados pode-se concluir que o extrato aquoso de alho apresenta um efeito fungistático sobre os isolados de *Foc* sendo uma forma de manejo alternativo.

Palavras-chave: *Allium sativum*, *Musa* spp., controle alternativo.

CONTROL OF PANAMA DISEASE WITH GARLIC EXTRACT

ABSTRACT

Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) is one of the main diseases that affect banana plantations causing great damage to economy. Plant extract is an alternative method to inhibit pathogen and control the disease. In this context, this research aimed to evaluate the fungitoxic effect of aqueous garlic extract on *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* and the frequency and severity of Panama disease on banana seedlings cv. Pacovan. Fungitoxic analysis was performed by a completely randomized design with treatments arranged in a 5x2 factorial scheme, corresponding to five concentrations of garlic extract ($C_1 = 0$; $C_2 = 2.5$; $C_3 = 5$; $C_4 = 7.5$ and $C_5 = 10\%$) and two *Foc* isolated (K01 and CMM-0807). Mycelial growth evaluations were carried out using a graduated scale in mm after 48, 72, 96, 120 and 144 h of disc insertion to the pathogen culture in PDA. Banana seedlings cv. Pacovan were used to evaluate Panama disease intensity. They were inoculated by immersion in a spore suspension of pathogens adjusted to 10^6 conidia mL^{-1} during 5 minutes and treated with garlic extract. The effect of garlic extract concentrations on Panama disease severity was evaluated at 90 days after inoculation using a 1-5 note scale. It was verified a reduction of mycelial growth of *Foc* isolated K01 and CMM-0807 with the increase in the concentration of garlic extract. The assessment of disease severity of K01 and CMM-0807 presented greater results when compared to CMM-2820 and CMM-2916. Thus, it may be concluded that aqueous garlic extract showed a fungistatic effect on *Foc* isolated as an alternative management method.

Keywords: *Allium sativum*, *Musa* spp., alternative control method.

INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é a segunda fruta mais consumida mundialmente, correspondendo a aproximadamente 10 kg hab⁻¹ ano⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2016), sendo superada apenas pela laranja (*Citrus* spp.). O Brasil é o quinto maior produtor mundial de banana, com produção de 6.793,260 milhões de toneladas em 2018, produzidas em pouco mais de 516 mil ha (IBGE, 2018). No Nordeste do Brasil, o estado da Bahia se destaca como maior produtor e a Paraíba é o quinto maior produtor nacional (IBGE, 2018).

A cultura da banana tem grande importância econômica e social. Essa fruta normalmente é consumida *in natura*, sendo integrante da alimentação das populações, principalmente, de baixa renda, devido seu alto valor nutritivo e baixo custo (MEDEIROS et al., 2013). No Brasil, a bananicultura gera cerca de 520 mil empregos de forma direta e indireta (OLIVEIRA et al., 2016) e, embora represente uma importante fonte renda para os bananicultores, a escolha da cultivar é importante, devendo-se considerar características agronômicas, como por exemplo, produtividade, resistência.

As cultivares de banana Maçã e Pacovan, estão entre as cultivares mais difundidas no Brasil devido sua aceitação no mercado (CARVALHO et al., 2011; RODRIGUES FILHO et al., 2014). No entanto, apresentam alta suscetibilidade ao ataque do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), agente causal do mal do Panamá (BORGES et al., 2007).

O mal do Panamá é uma doença que ameaça a produção mundial de banana, a qual ainda não houve êxito no desenvolvimento de práticas agrícolas eficazes para seu controle ou erradicação (CUNHA et al., 2015; SHEN et al., 2019) devido à sua natureza monocíclica. De acordo com Bidabadi e Sijun (2018), o *Foc* pode sobreviver por muitos anos na forma estrutural de resistência (clamidósporo). O manejo dessa doença, basicamente está restrito a substituição de variedades suscetíveis por variedades resistentes ou menos infectadas por esse patógeno (OLIVEIRA et al., 2016).

Nesse sentido, o uso de óleos essenciais e extratos vegetais surgem como alternativas de manejo com potencial para o controle de doenças em plantas cultivadas, devido suas propriedades antimicrobianas (AMORIM et al., 2011; FONSECA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2017). Os extratos vegetais apresentam metabólitos secundários (SPECIAN et al., 2014; SILVA et al., 2017), como alcalóides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados, saponinas, terpenos e triterpenos

(BARBOSA et al., 2017) que podem ter atividade antimicrobiana direta e/ou induzir a resistência nas plantas (AQUINO et al., 2017).

Portanto, levando em consideração a atividade fungicida dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos patogênicos, assim como a importância e necessidade do manejo do mal do Panamá, objetivou-se com este trabalho avaliar a ação do extrato aquoso de alho sobre a doença em mudas de bananeira Pacovan e sobre *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*).

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do experimento

O experimento foi realizado em duas etapas, ambas no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CCAA) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus II, em Lagoa Seca, Paraíba. A primeira etapa (*in vitro*) foi conduzida no Laboratório de Microbiologia e, a segunda (*in vivo*) em casa de vegetação.

Coleta do material vegetal e isolados

Foram realizados isolamentos em tecidos vegetais do pseudocaule de bananeira com sintomas da doença, onde foram selecionados dois isolados, K01 e K10, procedentes dos municípios de Lagoa Seca e Areia, no estado da Paraíba, respectivamente. Seis isolados procedentes de Pernambuco (dois isolados), Bahia (dois isolados) e Alagoas (dois isolados), sendo eles CMM-0807-PE, CMM-0813-PE, CMM-1236-BA, CMM-2820-BA, CMM-2910-AL, CMM-2916-AL foram cedidos pela Coleção Micológica de Fungos Fitopatogênicos Maria Menezes, do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

Teste de Agressividade

Para a avaliação da agressividade dos isolados, as colônias do fungo cresceram em BDA e em BOD com fotoperíodo 12-12 h, sob luz fluorescente a 25 °C, por sete dias. Após a esporulação, os conídios foram coletados adicionando-se 10 mL de água destilada estéril, onde foram raspados suavemente com alça de Drigalsky-tipo T, sobre as colônias e submetendo a suspensão à constante agitação manual para a liberação dos esporos.

Os conídios foram coletados após sete dias de incubação, em que foi determinada a concentração de suspensão de conídios na câmara de Neubauer. A partir dos valores médios das amostras colhidos, calculou-se a produção média de esporos em toda a colônia, resultando

em $3,9 \times 10^6$ e 2×10^6 esporos mL^{-1} de macro e microconídios, para os isolados K01 e CMN-0807, respectivamente.

Obtenção do extrato de Alho

Para a obtenção do extrato aquoso de alho, 10g de bulbos foram descascados e triturados em liquidificador durante três minutos. Após o preparo, ao material triturado foram adicionados 100 mL de água destilada, produzindo um extrato bruto de 10%, permanecendo na infusão à temperatura ambiente e em escuro total por 24 h, conforme metodologia proposta por Monteiro et al. (2013). Ao término desse período, foi filtrado em gaze estéril e filtro de papel Whatman (nº 1) para obtenção do extrato aquoso bruto.

Avaliação do efeito do extrato de alho no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

Foram utilizadas cinco concentrações do extrato aquoso de alho ($C_1 = 0$; $C_2 = 2,5$; $C_3 = 5$; $C_4 = 7,5$; e $C_5 = 10\%$) sobre o crescimento micelial dos isolados de *Foc* (K01 e CMN-0807). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos arranjos em esquema fatorial 5×2 , com cinco repetições.

O extrato foi adicionado em meio BDA fundente, nas concentrações de cada tratamento, e foi acondicionado um disco de quatro mm de cada isolado depositado no centro das placas de Petri. O comprimento da colônia foi medido com régua graduada em mm, após 48 h da inoculação do patógeno. Avaliações do crescimento micelial foram realizadas após 48, 72, 96, 120 e 144 h da deposição do disco com a cultura do patógeno na placa de Petri.

Avaliação do extrato de alho no manejo do mal do Panamá

A avaliação do extrato de alho no manejo do mal do Panamá foi realizada com dois isolados pré-selecionados, com maior crescimento micelial. Para a avaliação utilizaram-se mudas de bananeira da variedade Pacovan produzidas no Campus II da UEPB, retiradas das touceiras da planta. As mudas tinham a altura e diâmetro médio de 10 e 15 cm, respectivamente, e 100 dias de idade.

Os isolados de *Foc* foram cultivados em meio de cultura BDA e incubado a temperatura de 27°C , durante sete dias. A suspensão de esporos foi ajustada para 10^6 conídios mL^{-1} e obtida pela adição de 10 mL de ADE às placas de Petri contendo as colônias dos isolados, utilizando-se pincel de cerdas macias para a liberação dos esporos. A suspensão de esporos foi

filtrada em dupla camada de gaze esterilizada e a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Mudas de bananeira foram retiradas dos sacos e as raízes lavadas em água corrente para retirada de restos de substrato. A inoculação foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Rodriguez et al. (2014). Quatro perfurações (cinco mm de profundidade) foram feitas no rizoma da bananeira, com o auxílio de um bisturi esterelizado. Os recipientes para comportar todo sistema radicular das mudas foram esterelizados, e posteriormente, foram preenchidos com a suspensão do inóculo ajustada para 10^6 conídios mL^{-1} . Após a inoculação, as mudas foram acondicionadas em recipientes com as diferentes concentrações ($C_1 = 0$; $C_2 = 2,5$; $C_3 = 5$; $C_4 = 7,5$; e $C_5 = 10\%$) de extrato de alho, por 5 minutos. Após a inoculação do patógeno e tratamento das mudas com extrato de alho, as plantas foram replantadas em sacos de polietileno preto (3 L), contendo solo esterilizado e esterco bovino, na proporção 3:1 e acondicionadas em casa de vegetação. A irrigação das plantas ocorreu sempre que necessário para a manutenção do solo em capacidade de campo.

A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 90 dias após a inoculação das plantas, por meio da escala de notas de 1 a 5, conforme proposto por Rodriguez et al. (2014), em que, 1 = sem sintomas; 2 = descoloração inicial do rizoma; 3 = descoloração leve do rizoma do sistema vascular; 4 = rizoma com a maioria dos tecidos internos com necrose; 5 = rizoma totalmente necrosado. Os dados de severidade da doença foram utilizados para determinação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, empregando-se o esquema fatorial 5 x 2, com cinco repetições, sendo cada planta uma unidade experimental.

Análise dos Dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$), e no caso de significância, os tratamentos correspondentes às concentrações do extrato vegetal de alho foram analisados através de regressão com o *software* estatístico R[®] (Core Team R, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi detectada diferença significativa para o crescimento micelial dos isolados de *Foc*. Por outro lado, observaram-se efeitos significativos para as concentrações do extrato vegetal de alho ($p < 0,01$) sobre o crescimento micelial do fungo (Figura 1).

Para o crescimento micelial de K01 e CMM-0807 de *Foc* sob diferentes concentrações do extrato aquoso de alho, foram verificados resultados semelhantes, onde ambos se ajustaram ao modelo linear decrescente, o que significa que ocorreram decréscimos do crescimento micelial na ordem de 80,8 e 86,5% respectivamente, da menor concentração (0%) para a maior (10%) (Figura 1).

Os resultados encontrados no presente trabalho foram superiores aos observados por Aguiar (2008), quando se avaliou a eficiência de rizobactérias obtidas de bananeira ‘Prata-Anã’, no controle de crescimento micelial e esporulação de *Foc*, o qual observou uma redução de 50 e 27,85%, respectivamente.

A origem dos isolados pode influenciar a atividade antagônica ao micro-organismo alvo (SILVA, 2010). Neste contexto, Silva et al. (2012) estudando a atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos, concluíram que o extrato de alho suprimiu o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em 60,9%. Chalfoun e Carvalho (1987) demonstraram que o extrato de alho foi altamente eficiente na inibição do crescimento micelial de *Gibberella zeae* (anamorfo *Fusarium graminearum* Schwabe), *Alternaria zinniae* e *Macrophomina phaseolina*. De forma semelhante, Ribeiro e Bedendo (1999) constataram que os extratos aquosos de alho inibiram o desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo essa inibição diretamente proporcional ao aumento das concentrações utilizadas.

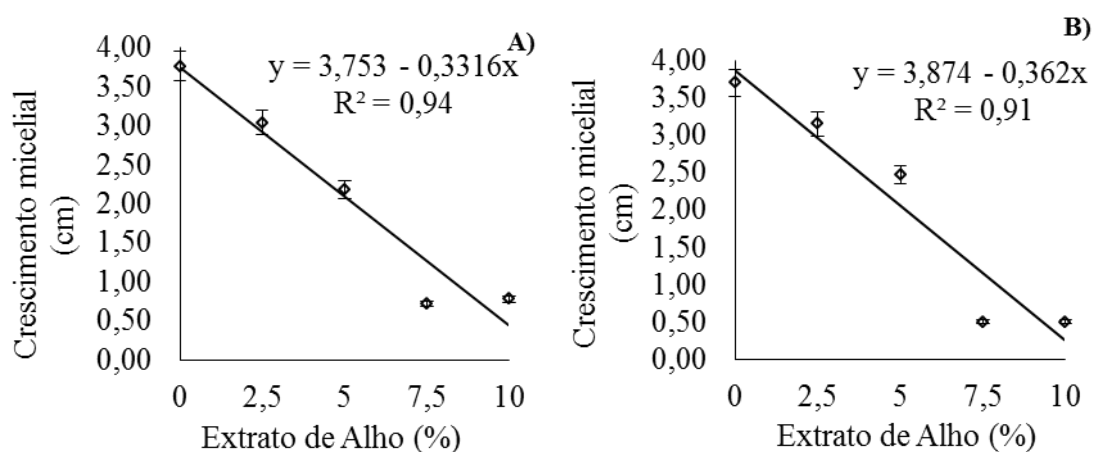


Figura 1. Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense*, isolados K01(A) e CMM-0807 (B) sob diferentes concentrações (0; 2,5; 5; 7,5 e 10%) do extrato aquoso de alho, aos 5 dias após inoculação em meio BDA em placas de Petri. Lagoa Seca, PB, 2019.

Conforme observado na Figura 2, foi detectada diferença significativa para a severidade dos isolados de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* em rizomas de bananeira Pacovan ($p < 0,01$). Os isolados K01 e CMM-0807 apresentaram melhores resultados quando comparados aos isolados CMM-2820 e CMM-2916.

Os resultados encontrados no presente trabalho são diferentes aos encontrados por Silva et al. (2009), quando constataram efeitos significativos em relação à severidade da fusariose e entre os extratos vegetais de alho, angico (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.), quando isolados ou combinados entre si no controle do fungo. Após 10 dias de inoculação, com exceção aos 16 dias, houve diferença entre os tratamentos com extrato de angico, e as combinações do extrato de alho+angico e alho+manjerição. Esses dados mostram que o conhecimento sobre a capacidade de diferentes isolados de um mesmo fungo é importante, pois potencializa sua utilização no manejo de plantas mais saudáveis em todas as fases de desenvolvimento da cultura.

Esses resultados são de fundamental importância, já que, a partir do estabelecimento do patógeno no solo, é praticamente impossível erradicá-lo, pois o mesmo pode sobreviver na ausência de plantas hospedeiras por vários anos (CORDEIRO, 2003; KUPPER, 2005). A capacidade de reduzir a esporulação do fungo pode reduzir a população de *Foc* no tempo e contribuir para o manejo da doença no campo (Souza, 2014).

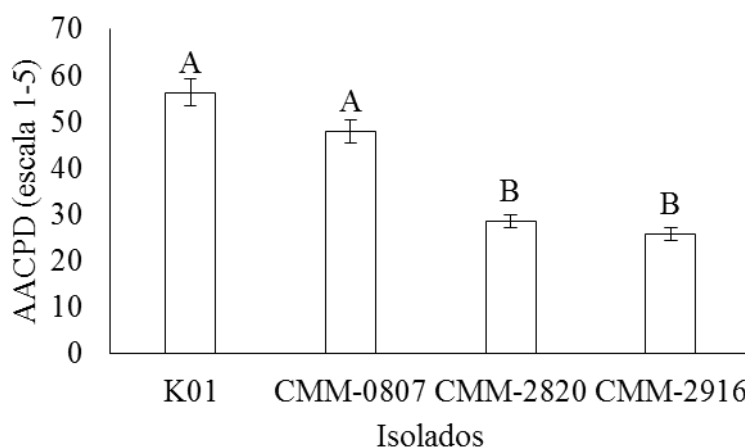


Figura 2. Severidade dos isolados de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* em rizomas de bananeira Pacovan inoculadas, em casa de vegetação. Lagoa Seca, PB, 2019.

Não foi verificada diferença significativa para a severidade do mal do Panamá entre os isolados de *Foc* em rizomas de bananeira Pacovan. No entanto, com relação às concentrações do extrato de alho foram observados efeitos significativos para essa variável ($p < 0,05$). Estes resultados corroboram aos encontrados por Lucon et al. (2000), os quais relataram que não

houve progresso da doença de isolados dos fungos *Pythium* sp., *F. solani* e *Sclerotium rolfsii*, quando utilizaram o extrato de alho.

As médias da severidade do mal do Panamá em rizomas de bananeira Pacovan em função das concentrações do extrato de alho tiveram ajuste quadrático para o isolado K01 (Figura 3A), com capacidade preditiva de $R^2 = 0,92^*$, e ajuste ao modelo linear com capacidade preditiva $R^2 = 0,82^*$ para o isolado CMM-0807 (Figura 3B).

A maior severidade da doença foi constatada na concentração de 2,5% (68), enquanto a menor severidade da doença foi observada com a aplicação de extrato de alho na concentração de 10% (40), assim, evidenciando o potencial efeito fungicida do extrato de alho sobre *Foc*.

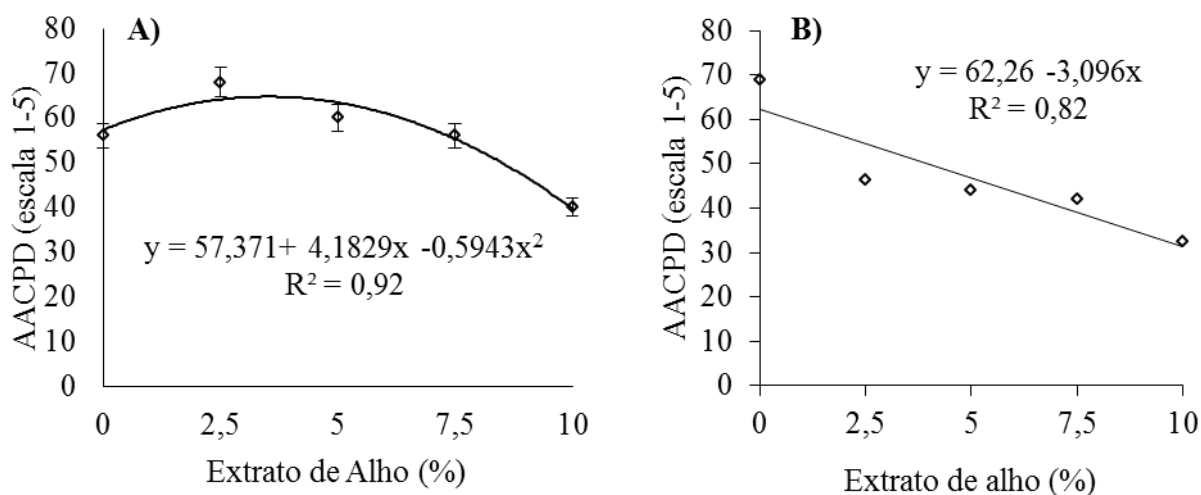


Figura 3. Severidade do isolado K01 (A) e CMM-0807 (B) de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* em rizomas de bananeira Pacovan, em casa de vegetação sob efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de Alho. Lagoa Seca, PB, 2019.

Houve uma redução do progresso da doença em 28% para a concentração de 10% do extrato aquoso de alho quando comparado ao controle (0%). Por outro lado, houve maior redução (41%) da severidade da doença para a concentração de 10% de extrato de alho quando comparada a concentração de 2,5% (Figura 3A). Para o isolado CMM-0807 houve reduções significativas da severidade da doença com a aplicação do extrato de alho (Figura 3B). Estas reduções foram de 32, 36, 39 e 60% para as concentrações de 2,5, 5, 7,5 e 10% do extrato de alho, respectivamente, quando comparadas ao controle (0%).

De acordo com Linhares et al. (2016) doenças causadas por patógenos que habitam o solo aumentam a densidade de propágulos na rizosfera de plantas hospedeiras, tornando-se em um fator determinante para o maior progresso da doença. O conhecimento do efeito fungicida

do extrato aquoso de alho sobre o controle de fungos patogênicos, como o *Foc*, surge como uma alternativa em potencial para o manejo do mal do Panamá, fundamental para minimizar a pressão de seleção de patógenos resistentes, assim como, a contaminação ambiental pelo uso de fungicidas químicos, visto que o crescimento micelial do fungo na bananeira variedade Pacovan reduziu com a aplicação das concentrações do extrato de alho.

CONCLUSÕES

O extrato aquoso de alho foi eficiente na redução do crescimento micelial dos isolados de *Foc* testados, sendo a redução do crescimento micelial diretamente proporcional ao aumento das concentrações do extrato.

Os isolados K01 e CMM-0807 de *Foc* sob diferentes concentrações do extrato aquoso de alho, tiveram um decréscimo do crescimento micelial na ordem de 80,8 e 86,5% respectivamente, da menor concentração (0%) para a maior (10%).

Com relação a severidade da doença os isolados K01 e CMM-0807 apresentaram melhores resultados quando comparados aos isolados CMM-2820 e CMM-2916.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, F. M. Avaliação *in vitro* de isolados de rizobactérias no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba - MG, 2008.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. Ed. UFV. 2007.

AMORIM, E. P. R.; ANDRADE, F. W. R.; MORAES, E. M. S.; SILVA, J. C.; LIMA, R. S.; LEMOS, E. E. P. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, p.392-398, 2011.

AQUINO, V. V. F.; COSTA, J. G. M.; ANGELICO, E. C.; MEDEIROS, R. S.; ARAUJO, M. F.; RODRIGUES, O. G. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v.3, n.1, p.7-10, 2017.

BARBOSA, H. M.; ALBINO, A. M.; CAVALCANTE, F. S.; LIMA, R. A. Abordagem fitoquímica de metabólitos secundários em *Solanum acanthodes* (Solanaceae) Hook. **Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v.4, n.1, p.30-41, 2017.

BIDABADI, S. S.; SIJUN, Z. Banana fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) control and resistance, in the context of developing wilt-resistant bananas within sustainable production systems. **Horticultural Plant Journal**, v.4, n.5, p.208-218, 2018.

BORGES, A. J. S.; TRINDADE, A. V.; MATOS, A. P.; PEIXOTO, M. F. S. Redução do mal-do-Panamá em bananeira-Maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.1, p.35-41, 2007.

CARVALHO, A. V.; SECCADIO, L. L.; MOURÃO JÚNIOR, M.; NASCIMENTO, W. M. O. Qualidade pós-colheita de cultivares de bananeira do grupo ‘Maçã’, na região de Belém - PA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.4, p.1095-1102, 2011.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.3, p.234-235, 1987.

CORDEIRO, Z. J. M. **Cultivo da Banana para o Projeto Formoso**. Cruz das Almas, BA. Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2003.

CUNHA, C. M. S.; HINZ, R. H.; PEREIRA, A.; TCACENCO, F. A.; PAULINO, E. C.; STADNIK, M. J. A SCAR marker for identifying susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana. **Scientia Horticulturae**, v.191, p.108-112, 2015.

FIGUEIREDO, Y. F.; ALTOÉ, L. S.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, G. A. A.; SILVA, M. B. Controle alternativo de *Colletotrichum musae* com extrato de mil folhas. **Revista Fitos**, v.11, n.2, p.119-249, 2017.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. S.; GONÇALVES, M. G.; PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G.; PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas

medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.45-50, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>> Acesso em: 25 de nov. de 2018.

KUPPER K. C. Mal-do-Panamá. In: FERRARI, J. T.; MORAES, W.; SANTOS, A. S. (Coord). Cultura da Banana. Registro SP. **Anais...** XIII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. 2005.

LINHARES, C. M. S.; FREITAS, F. C. L.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; CRUZ, B. L. S.; DANTAS, A. M. M. Efeito de coberturas do solo sobre a sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* no feijão-caupi. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.2, p.155-159, 2016.

LUCON, C. M. M.; CORRÊA, C. K. G.; GUZZO, S. D.; CRUZ, A. G. Efeito de extratos de diferentes plantas no crescimento miceliano de fitopatógenos. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 13. 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: RAIB, 2000. p. 81.

MEDEIROS, A. S.; CAMPOS, A. C.; ALVES, F. I. S.; ABRANTES, E. G.; SANTOS, J. G. R. Produção da bananeira nanica (1º ciclo) em função da aplicação de doses de biofertilizantes líquidos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.8, n.5, p.105-115, 2013.

MONTEIRO, F. P.; FERREIRA, L. C.; SILVA, J. L.; PACHECO, L. P.; SOUZA, P. E. Influence of plant extracts and essential oils against Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) in banana seedlings. **Journal of Agricultural Science**, v.5, n.4, p.63-74, 2013.

OLIVEIRA, E. S.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V. Alternativas a fungicidas sintéticos no controle da antracnose da banana. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.4, p.340-350, 2016.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1267-1271, 1999.

RODRIGUES FILHO, V. A.; DONATO, S. L. R.; SILVA, T. S.; AMORIM, E. P. Características agronômicas e ocorrência de mal-do-Panamá em bananeiras tipo Pacovan. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.2, p.515-519, 2014.

RODRIGUEZ, M. A. D.; VICENTE, L. P.; MARTÍNEZ, E. Inoculation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causal agent of fusarium wilt in banana. Food and agriculture organization of the united nations may (FAO). 2014.

SHEN, Z.; XUE, C.; PENTON, C. R.; THOMASHOW, L. S.; ZHANG, N.; WANG, B.; RUAN, Y.; LI, R.; SHEN, Q. Suppression of banana Panama disease induced by soil microbiome reconstruction through an integrated agricultural strategy. **Soil Biology and Biochemistry**, v.128, p.164-174, 2019.

SILVA, C. P.; RICCI, T. G.; ARRUDA, A. N.; PAGLIOSA, F. M.; MACEDO, M. L. R. Extratos vegetais de espécies de plantas do Cerrado sul-matogrossense com potencial de bioherbicida e bioinseticida. **Uniciências**, v.21, n.1, p.25-34, 2017.

SILVA, J. A.; PEGADO, C. M. A.; RIBEIRO, V. V.; BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em sementes de Caupi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.611-616, 2009.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. P.; PESSOA, J. O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.7, n.1, p.80-86, 2012.

SILVA, L. S. Efeito de extratos foliares de Nim em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e na intensidade do mal-do-Panamá em mudas de bananeira cv. Maçã. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal do Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba - MG, 2010.

SOUZA, G. L. O. D. Potencial de bactérias endofíticas como bioinoculantes para mudas de bananeira 'Prata-Anã'. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba - MG, 2014.

SPECIAN, V.; ORDLANDELLI, R.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Ciências Biológicas da Saúde**, v.16, n.4, p.345-51, 2014.